



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας II: Ανάπτυξης, Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Διεργασιών και Συστημάτων
Εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς

Ανάκτηση βιοδραστικών εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς με χρήση υπερκρίσιμου CO₂

Διπλωματική Εργασία



Μαριάννα Πουλογιαννοπούλου

Επιβλέπων Καθηγητής: Επαμεινώνδας Βουτσάς

Αθήνα
2019

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη.....	5
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή	9
2. Θεωρητικό Μέρος.....	11
2.1. Πρώτη Ύλη.....	11
2.1.1. Η Ελιά.....	11
2.1.2. Ιδιότητες Φύλλων Ελιάς.....	13
2.1.3. Συστατικά Φύλλων Ελιάς	14
2.1.4. Χρήσεις Εκχυλίσματος Φύλλων Ελιάς	15
2.1.5. Μέθοδοι Απομόνωσης Συστατικών Φύλλων Ελιάς.....	16
2.2. Υπερκρίσιμη Εκχύλιση – Supercritical Fluid Extraction (SFE)	17
2.2.1. Υπερκρίσιμα Ρευστά.....	17
2.2.2. Μέθοδος Λειτουργίας Υπερκρίσιμης Εκχύλισης	18
2.2.3. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα Διεργασίας	19
2.2.4. Εφαρμογές Υπερκρίσιμης Εκχύλισης σε μεγάλη κλίμακα	20
2.2.5. Διαλύτες	20
2.3. Χημικές Ιδιότητες Εκχυλισμάτων	24
2.3.1. Αντιοξειδωτική Δράση	24
2.3.2. Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο.....	25
2.4. Μοντελοποίηση Υπερκρίσιμης Εκχύλισης.....	26
2.4.1. Sulaiman (2013)	26
2.4.2. So & MacDonald (1986).....	28
2.4.3. Sonova (1993).....	29
3. Πειραματικό Μέρος	32
3.1. Πρώτη Ύλη.....	32
3.1.1. Συλλογή.....	32
3.1.2. Πλύση	32
3.1.3. Μέτρηση Υγρασίας.....	33
3.1.4. Άλεση – Κοσκίνισμα.....	33
3.1.5. Αποθήκευση	34

3.2.	Υπερκρίσιμη Εκχύλιση	35
3.2.1.	Πειραματική Διάταξη και Διαδικασία	35
3.2.2.	Συλλογή Εκχυλισμάτων	41
3.2.3.	Συν-διαλύτες	42
3.3.	Ανάλυση Εκχυλισμάτων	44
3.3.1.	Προετοιμασία Εκχυλισμάτων	44
3.3.2.	Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης.....	46
3.3.3.	Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου.....	47
4.	Αποτελέσματα – Σχολιασμός	49
4.1.	Υγρασία Πρώτης Ύλης	49
4.2.	Πειράματα Υπερκρίσιμης Εκχύλισης	49
4.3.	Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης Εκχυλισμάτων.....	54
4.4.	Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου	57
4.5.	Μοντελοποίηση Υπερκρίσιμης Εκχύλισης.....	59
4.5.1.	Sulaiman et al (2012)	60
4.5.2.	So & MacDonald (1986).....	62
4.5.3.	Sonova et al (1993).....	66
4.5.4.	Σύγκριση μοντέλων	68
5.	Συμπεράσματα – Προτάσεις.....	72
5.1.	Γενικά Συμπεράσματα	72
5.2.	Προτάσεις για το Μέλλον	74
6.	Βιβλιογραφία.....	75
	Παράρτημα 1	80
	Ευρετήριο Εικόνων	82
	Ευρετήριο Διαγραμμάτων.....	83
	Ευρετήριο Πινάκων.....	85

Ευχαριστίες

Με τη διπλωματική αυτή ολοκληρώνεται μια σημαντική πενταετία της ζωής μου, γεμάτη ουσιαστική γνώση και δημιουργικότητα. Μέσα από τη σχολή μου, εκτός από Χημικός Μηχανικός καταξιώθηκα και ως άνθρωπος. Έμαθα την πειθαρχία, κυρίως κατά την εξεταστική περίοδο, τη συνεργασία, που πολλές φορές με δυσκόλεψε και την εφευρετικότητα ώστε να βρίσκω τον πιο αποτελεσματικό τρόπο να λύνω προβλήματα, είτε επιστημονικά είτε προσωπικά. Ωρίμασα στη σκέψη, αντιλήφθηκα τις δυνάμεις μου, κουράστηκα πολλές φορές χωρίς αποτέλεσμα αλλά ακόμα περισσότερες φορές με επιτυχία.

Όλα αυτά τα οφείλω σε ανθρώπους οι οποίοι με διαφορετικούς τρόπους συνέβαλαν στην εξέλιξή μου και χωρίς εκείνους δε θα είχα φτάσει ως εδώ. Το λιγότερο που μπορώ να τους πω είναι «Ευχαριστώ».

Θέλω να ευχαριστήσω λοιπόν, τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Επαμεινώνδα Βουτσά για την ανάθεση της πειραματικής αυτής εργασίας της υπερκρίσιμης εκχύλισης. Από τα πρώτα χρόνια της φοίτησής μου εκτίμησα τη μεταδοτικότητά του και το πραγματικό ενδιαφέρον προς τους φοιτητές του και γι' αυτό είμαι χαρούμενη που συνεργάστηκα μαζί του. Επιπλέον, ευχαριστώ και τον κοσμήτορα της σχολής κ. Κωστή Μαγουλά για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην κ. Βίκη Λούλη (ΕΔΙΠ) για την καθοριστική βοήθειά της στην υλοποίηση των πειραμάτων, τη συγγραφή της εργασίας αλλά και την ψυχολογική υποστήριξη. Την ευχαριστώ ακόμα για την υπομονή της και την προθυμία της να μου απαντάει στις πολλές ερωτήσεις μου αλλά και για τη σιγουριά που μου μετέδιδε σε στιγμές ανησυχίας.

Δε μπορώ να παραλείψω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου με τα οποία υπήρξε αλληλοβοήθεια και οι ώρες περνούσαν ευχάριστα. Πιο συγκεκριμένα ευχαριστώ την κ. Γωγώ Παππά και το Νίκο Κάτση στον οποίο οφείλω την εξοικείωσή μου με τη συσκευή υπερκρίσιμης εκχύλισης. Θα ήθελα επίσης να ξεχωρίσω την Ιουλία Γεωργιοπούλου, πλέον υποψήφια διδάκτορ, με την οποία μοιράστηκα καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου όλες τις εξελίξεις, ευχάριστες ή δυσάρεστες και στεκόταν δίπλα μου πάντα με χαμόγελο και καλή διάθεση. Ακόμα, ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στη Μαρίνα Σταμάρκου και τις συνεργατίδες της στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, που με δίδαξαν πάνω στις χημικές αναλύσεις και μου έδιναν λύσεις σε όποιο εμπόδιο.

Ευχαριστώ ακόμα και την κ. Μαρία, τη γειτόνισσά μου που μου επέτρεψε να συλλέξω μαζί με τον πατέρα μου τα φύλλα από τις ελιές που καλλιεργεί στην αυλή της.

Τέλος, την πιο βαθιά μου ευγνωμοσύνη θέλω να εκφράσω σε όλη μου την οικογένεια και κυρίως στους γονείς μου, Σταύρο και Κατερίνα, στους οποίους και αφιερώνω τις σπουδές μου, για τη συμπαράστασή τους και την αγάπη τους.

Συγχρόνως, θα πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην αδερφή μου Ελένη, τον Παύλο, το Γιάννη και τον π. Ηλία που αποτελούν παράδειγμα για εμένα και με εμπνέουν.

Περίληψη

Η ελιά είναι ένα φυτό που καλλιεργείται στην Ελλάδα και αποδίδει σε πολύτιμα προϊόντα (ελιές, λάδι). Ωστόσο, τα φύλλα της αποτελούν ένα ανεκμετάλλευτο παραπροϊόν της γεωργίας, το οποίο περιέχει ουσίες με αξιόλογα χαρακτηριστικά. Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται το εκχύλισμά τους κυρίως ως πρόσθετο τροφίμων ή καλλυντικών και συμπλήρωμα διατροφής. Παρουσιάζει ευεργετικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία, όπως αντιθρομβωτικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις.

Μια «Πράσινη» μέθοδος εκχύλισης είναι η υπερκρίσιμη, η οποία εκμεταλλεύεται τις ιδιότητες των υπερκρίσιμων ρευστών και λειτουργεί σε ήπιες θερμοκρασίες ιδανικές για τα θερμο-ευαίσθητα συστατικά των φύλλων. Ταυτόχρονα, ένας φιλικός προς το περιβάλλον διαλύτης είναι το CO₂, που είναι μη τοξικός, μη εύφλεκτος και οικονομικός, και οδηγεί σε εκχυλίσματα ποιοτικά αναβαθμισμένα λόγω της μη θερμικής καταπόνησης και χημικής τους αλλοίωσης καθώς είναι απαλλαγμένα από διαλύτη.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η πειραματική μελέτη της ανάκτησης βιο-δραστικών ουσιών από φύλλα ελιάς με την τεχνική της υπερκρίσιμης εκχύλισης με χρήση CO₂. Εξετάζονται διάφορες λειτουργικές παράμετροι της μεθόδου, των οποίων η επίδραση αντικατοπτρίζεται στην απόδοση της διεργασίας και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των εκχυλισμάτων. Συγχρόνως, πραγματοποιείται μοντελοποίηση της διεργασίας αυτής με τρία μαθηματικά μοντέλα διαφορετικής πολυπλοκότητας.

Οι λειτουργικές παράμετροι που μελετήθηκαν είναι η πίεση (150, 200 και 250 bar) και η θερμοκρασία λειτουργίας (40 και 50 °C), η κοκκομετρία των αλεσμένων φύλλων της ελιάς (257 και 493 μm) και η προσθήκη συν-διαλύτη. Οι συν-διαλύτες μελετήθηκαν με σκοπό την επίτευξη καλύτερης απόδοσης της εκχύλισης, καθώς και την ανάκτηση περισσότερο πολικών συστατικών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν η αιθανόλη και το ιοντικό υγρό 2-Hydroxy EthylAmmonium Formate (2 – HEAF).

Τα αποτελέσματα έδειξαν καλύτερη απόδοση στην υψηλότερη πίεση και θερμοκρασία, όπως και στη μικρότερη διάμετρο των αλεσμένων φύλλων. Επιπρόσθετα, η προσθήκη συν-διαλύτη οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης τόσο για την αιθανόλη όσο και για το μίγμα αιθανόλης – 2-HEAF.

Όσον αφορά τα εκχυλίσματα, αυτά εξετάστηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με τη μέθοδο ελεύθερης ρίζας DPPH και ως προς το ολικό φαινολικό τους περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu. Δραστικά εκχυλίσματα χαρακτηρίστηκαν κυρίως αυτά που εκχυλίστηκαν με συν-διαλύτη αιθανόλη και σε μικρότερο βαθμό εκείνα με καθαρό CO₂.

Η μαθηματική μοντελοποίηση της υπερκρίσιμης εκχύλισης πραγματοποιήθηκε με τα μοντέλα των Sulaiman, So & MacDonald και Sonona. Καλύτερη προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα παρατηρείται στα μοντέλα So & MacDonald και Sonona. Το Sulaiman είναι ένα απλούστερο μοντέλο και δεν περιγράφει ικανοποιητικά τα διακριτά στάδια της εκχύλισης.

Συμπερασματικά, η υπερκρίσιμη εκχύλιση αποδεικνύεται ότι είναι ένας αποτελεσματικός και φιλικός προς το περιβάλλον τρόπος ανάκτησης βιοδραστικών ενώσεων από φύλλα της ελιάς. Η προσθήκη συν-διαλύτη αυξάνει την απόδοση και την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Φυσικά, για την παραλαβή ξηρού εκχυλίσματος απαιτείται μια επιπλέον διαδικασία αυτή της εξάτμισης του διαλύτη. Επομένως, η επιλογή έγκειται στη χρήση που θα έχει το εκχύλισμα, καθώς σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως διάλυμα.

Λέξεις Κλειδιά:

Φύλλα Ελιάς, Υπερκρίσιμη Εκχύλιση, Αντιοξειδωτική Δράση, Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο, Μαθηματική Μοντελοποίηση

Abstract

The olive tree is a plant grown in Greece and yields valuable products (olives, olive oil). However, olive leaves are an unused by-product from agriculture that contains substances with remarkable characteristics. Recently, olive leaf extract has started being used as a food or cosmetic additive as well as a nutritional supplement. It has a variety of health benefits, such as antithrombotic, antimicrobial and anti-inflammatory.

The supercritical fluid extraction method is a 'green' extraction method that exploits the properties of supercritical fluids, operating at mild temperatures which are ideal for the thermal sensitive leaf components. On the other hand, CO₂ is an environmentally friendly, non-toxic, non-flammable and cheap solvent that results in high quality and solvent-free extracts.

The purpose of this diploma thesis is the experimental study of the supercritical fluid extraction of bio-active extracts from olive leaves using CO₂. Different operating parameters which were investigated showed how they influenced the yield of the process and the quality of the extracts. Furthermore, this process was modeled and conclusions for three mathematical models of different complexity were drawn.

The operating conditions that were examined are pressure (150, 200 and 250 bar), and temperature (40 and 50 °C), the olive leaf granulometry (257 and 493 µm) and the addition of a co-solvent. Co-solvents were added to achieve better yield as well as the extraction of more polar components. The two that were chosen were ethanol and the ionic liquid 2-Hydroxy EthylAmmonium Formate (2 – HEAF).

The best results were acquired at the higher pressure and temperature, and with smaller leaf diameter. Moreover, the addition of co-solvent led to an increase in the yield for both ethanol and ethanol-2-HEAF mixture.

As far as the extracts are considered, they were examined for their antioxidant activity using the free radical DPPH method and for their total phenolic content using the Folin - Ciocalteu method. Better results were observed when a co-solvent was used along with CO₂ than when CO₂ was used alone.

The mathematical modelling of the supercritical fluid extraction was performed with the models of Sulaiman, So & MacDonald and Sovova. Better adaptation to the experimental data was observed in the So & MacDonald and Sovova models. Sulaiman is a simpler model and does not adequately describe the stages of the extraction.

In conclusion, supercritical fluid extraction has proven to be an efficient and environmentally friendly way of recovering bioactive compounds from olive leaves. The addition of a co-solvent may increase the yield and the antioxidant activity of the extracts, but in order to have a solvent-free extract an extra procedure must

be done. Therefore, the choice lies in the use of the extract, because in some cases it can be used as a solute.

Key Words:

Olive Leaves, Supercritical Fluid Extraction, Antioxidant Activity, Total Phenolic Compound, Mathematical Modelling

1. Εισαγωγή

Στη σημερινή εποχή, οι επιπτώσεις από τη συνεχή υποβάθμιση του περιβάλλοντος είναι εμφανείς στην καθημερινότητα και την υγεία των ανθρώπων αλλά και των υπόλοιπων ζωντανών οργανισμών στον πλανήτη. Η στρόφη στην “Πράσινη Τεχνολογία” και η υιοθέτηση μιας νοοτροπίας αξιοποίησης της φύσης μέσω του απαραίτητου σεβασμού προς αυτή είναι πλέον επιτακτική ανάγκη. Για τη βελτίωση της ποιότητας της ζωής γενικότερα, ο χώρος της βιομηχανίας οφείλει να στρέψει το ενδιαφέρον του στη χρήση φυσικών πρώτων υλών, την εφαρμογή διεργασιών που επιβαρύνουν όσο το δυνατόν λιγότερο το περιβάλλον και την εξοικονόμηση της ενέργειας.

Η Ελλάδα είναι ένας ευλογημένος τόπος με μεγάλη αφθονία τόσο σε ορυκτούς πόρους όσο και σε ποικιλία πανίδας και χλωρίδας. Ευδοκιμούν πολλά είδη φυτών αξιοποιήσιμα σε διάφορους τομείς όπως στην παραγωγή αιθέριων ελαίων, καλλυντικών, τροφίμων, φυτικών φαρμάκων αλλά και βιομάζας. Ένα από αυτά είναι και η ελιά, ένα δέντρο μεγάλης ιστορικής σημασίας και με προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας.

Στη χημική βιομηχανία έχουν αναπτυχθεί διάφορες εκχυλιστικές μέθοδοι για την ανάκτηση επιθυμητών ουσιών από φυτικές μήτρες. Μια αρκετά διαδεδομένη εξ αυτών είναι η εκχύλιση με χρήση υπερκρίσιμων διαλυτών. Το στοιχείο που την ξεχωρίζει είναι η παραλαβή ανώτερου ποιοτικά εκχυλίσματος έναντι συμβατικών μεθόδων, όπως η απόσταξη και η υγρή εκχύλιση, λόγω των ιδιοτήτων των υπερκρίσιμων ρευστών. Ο διαλύτης απομακρύνεται από το τελικό προϊόν μεταβάλλοντας απλώς τη θερμοκρασία και την πίεση, γεγονός που το καθιστά ασφαλές προς ανθρώπινη χρήση.

Ο πιο διαδεδομένος υπερκρίσιμος διαλύτης, ιδιαίτερα κατά την επεξεργασία τροφίμων, είναι το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2). Η ουσία αυτή είναι μη τοξική, μη εύφλεκτη, φθηνή, άφθονη, εύκολα διαθέσιμη και μπορεί να ανακυκλωθεί μέσα σε μια διεργασία.

Ένα υπερκρίσιμο ρευστό, όταν συνδυάζεται με κάποιο συν-διαλύτη αποκτά αυξημένη διαλυτική ικανότητα και επηρεάζεται η εκλεκτικότητά του. Στο χώρο των τροφίμων, των φαρμάκων και των καλλυντικών ο συν-διαλύτης που επιλέγεται είναι απαραίτητο να είναι μη τοξικός, τουλάχιστον έως κάποια συγκέντρωση.

Η μοντελοποίηση μιας διεργασίας όπως η υπερκρίσιμη εκχύλιση είναι ιδιαίτερα σημαντική. Με την περιγραφή των πειραματικών δεδομένων από μαθηματικά μοντέλα δίνεται η δυνατότητα κατανόησης και βελτιστοποίησης της διεργασίας καθώς και της κλιμάκωσης μεγέθους της (scale – up) για το σχεδιασμό της σε βιομηχανική κλίμακα.

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής επιχειρείται η παραλαβή βιο-δραστικών ενώσεων από φύλλα ελιάς μέσω της υπερκρίσιμης εκχύλισης με διοξείδιο του

άνθρακα (CO_2). Πιο συγκεκριμένα γίνεται μελέτη ορισμένων λειτουργικών παραμέτρων της διεργασίας, όπως η πίεση και η θερμοκρασία λειτουργίας, η κοκκομετρία της πρώτης ύλης και η προσθήκη συν-διαλύτη. Οι συν-διαλύτες που επιλέγονται είναι η αιθανόλη και το μίγμα αιθανόλης και ιοντικού υγρού (2 – HEAF: αιθανολαμίνη και φορμικό οξύ). Ακολουθεί η διερεύνηση των λαμβανόμενων εκχυλισμάτων ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Η σύγκριση των πειραμάτων γίνεται με κριτήριο την τελική απόδοση τους και την ποιότητα των εκχυλισμάτων. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται η μοντελοποίηση της διεργασίας αυτής με τρία μαθηματικά μοντέλα (Sulaiman , So & MacDonald, Sonova).

Σχετικά με τη δομή που ακολουθείται, αρχικά, παρατίθενται τα χαρακτηριστικά του δένδρου της ελιάς και των φύλλων της. Παρουσιάζονται οι φυσικές ιδιότητες που διαθέτουν και η χρησιμότητα του εκχυλίσματός τους, καθώς και οι μέθοδοι που κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή του. Στη συνέχεια, δίνεται το θεωρητικό υπόβαθρο της τεχνολογίας των υπερκρίσιμων ρευστών και της εκχύλισης με χρήση αυτών, αναγνωρίζονται τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου και παρουσιάζονται οι εφαρμογές της στη βιομηχανία. Επιπρόσθετα παρατίθενται οι απαραίτητες γνώσεις για τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται, τα μαθηματικά μοντέλα και την αρχή μεθόδου για κάθε αναλυτική τεχνική. Το επόμενο κεφάλαιο αφορά στο πειραματικό μέρος, όπου περιγράφονται οι μεθοδολογίες που εφαρμόστηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Ακολουθούν τα αποτελέσματα, η σύγκρισή τους και ο σχολιασμός τους για όσα έχουν ειπωθεί. Τέλος, αναφέρονται ορισμένα συμπεράσματα στα οποία καταλήγει η εργασία αυτή και προτάσεις για μελλοντική εργασία πάνω στο θέμα.

2. Θεωρητικό Μέρος

2.1. Πρώτη Ύλη

2.1.1. Η Ελιά

Το δέντρο της ελιάς, σύμφωνα με την αρχαία ελληνική παράδοση έχει ως πατρίδα την Αθήνα. Κατά τη μυθολογία, η Αθήνα πήρε το όνομα της θεάς Αθηνάς κερδίζοντας τη διαμάχη έναντι του θεού Ποσειδώνα και προσφέροντας ως δώρο στην πόλη την ελιά. Έτσι, η πρώτη ελιά του κόσμου φύτευσε στην Ακρόπολη. Έκτοτε, η ελιά θεωρήθηκε ιερό δέντρο, σύμβολο της σοφίας και της ειρήνης και το στεφάνι από κλαδιά αγριελιάς (κότινος) σύμβολο των Ολυμπιακών αγώνων. Ιστορικά, η ελιά προέρχεται από την ανατολική Μεσόγειο και οι Έλληνες ήταν εκείνοι που πρώτοι την καλλιέργησαν, αν και άλλες πηγές θεωρούν ως πρώτους καλλιεργητές τους Φοίνικες. Ήδη από το 4000 π.Χ. ήταν γνωστές οι αρωματικές και οι θεραπευτικές ιδιότητες του ελαιόλαδου και η αξία του ελαιόκαρπου, ενώ οι Αιγύπτιοι αξιοποιούσαν το εκχύλισμα από τα φύλλα της ελιάς για τη διατήρηση του σώματος των νεκρών, αφού παρεμπόδιζε την ανάπτυξη μικροοργανισμών [1].

Η ελιά, λοιπόν, αποτελεί το εθνικό δέντρο της Ελλάδας και η εξάπλωσή της στη χώρα είναι μεγαλύτερη από κάθε άλλο είδος καρποφόρου δέντρου [2]. Αξίζει επομένως να μελετηθεί.

Η Ελιά ή Ελαιόδενδρο είναι Αγγειόσπερμο Δικότυλο φυτό που κατατάσσεται στην τάξη Ελαιώδη (Oleales), οικογένεια Ελαιίδες (Oleaceae), γένος Ελαία (Olea). Η επιστημονική ονομασία της κοινής ελιάς είναι *Olea Europaea*. Η καλλιεργούμενη ελιά είναι αειθαλές δένδρο που ζει πολλές εκατοντάδες χρόνια και φτάνει σε ύψος περίπου 15 μέτρων [2]. Ο φλοιός της είναι γκρίζος και ξηρός, ενώ το φύλλωμα πολυετές, λογχοειδές με σκουροπράσινο



Εικόνα 1: Ελαιόδενδρο

χρώμα στην άνω επιφάνεια και αργυρόχρωμο στην κάτω. Ευδοκίμει σε εύκρατο κλίμα, μέσης θερμοκρασίας 16°C και υγρασία, γι' αυτό είναι ευρέως διαδεδομένη στη Μεσογειακή ζώνη. Η Ισπανία είναι η χώρα με τη μεγαλύτερη παγκόσμια παραγωγή ελιάς και ελαιόλαδου, ακολουθούμενη από την Ιταλία και στη συνέχεια την Ελλάδα. Στις υπόλοιπες χώρες της Μεσογείου, επίσης ευδοκίμει η ελιά (Τουρκία, Μαρόκο, Συρία, Αλγερία, Τυνησία, Αίγυπτος, Πορτογαλία) όπως και σε πολλές άλλες χώρες του κόσμου όπου το κλίμα το επιτρέπει. Οι παραθαλάσσιες περιοχές είναι ιδανικές για την καλλιέργειά της, ώστε να μην πέφτει η θερμοκρασία υπό το μηδέν [2].

Τα δέντρα φυτεύονται σε ευθείες σειρές ή σε ρομβοειδείς διατάξεις [1]. Η καρποφορία συχνά είναι ακανόνιστη, αλλά όπου δε πραγματοποιείται λίπανση και άρδευση η ελιά καρποφορεί κάθε δύο χρόνια. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης όλοι οι καρποί των ελιών αλλάζουν χρώμα από πράσινο σε βιολετί και τέλος σε μαύρο. Σχετικά με τις ποικιλίες υπάρχουν τρεις βασικές κατηγορίες ελιάς, ανάλογα με το μέγεθος του καρπού: Μικρόκαρπες (παραγωγή λαδιού), Μεσόκαρπες (ελαιοπαραγωγή, βρώση) και Αδρόκαρπες (βρώση) [2]. Τα διάφορα είδη κάθε κατηγορίας φαίνονται παρακάτω:

Μικρόκαρπες

- Κορωνέικη (η πιο διαδεδομένη ποικιλία σε όλη την Ελλάδα)
- Τσουνάτη (Αθηνολιά)
- Λανιολιά Κερκύρας
- Λαδολιά Πατρών

Μεσόκαρπες

- Μεγαρίτικη
- Βαλαιολιά
- Θρούμπα
- Κοθρέικη (Μανάκι)

Αδρόκαρπες

- Καλαμών
- Κονσερβολιά (Αμφίσσης)
- Κολυμπάδα



Εικόνα 2: Ελιά Κορωνέικη



Εικόνα 3: Ελιά Καλαμών

Στην εργασία αυτή, για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν φύλλα ελιάς ποικιλίας Καλαμών. Η συγκεκριμένη ποικιλία διαθέτει μεγάλα φύλλα με κυματοειδή χείλη και μεγάλο ωοειδή επιμήκη καρπό. Καλλιεργείται κυρίως στην Πελοπόννησο και είναι παγκοσμίως η πιο γνωστή ελιά “τραπεζιού”. Αυτό αποδεικνύεται άλλωστε με πολλές βραβεύσεις, όπως η κατάκτηση της πρώτης θέσης στον διαγωνισμό «Aristoleo High Phenolic Olives Awards 2019» των

Ελαιώνων Σακελλαρόπουλου για τη βιολογική ελιά Καλαμών, με κριτήριο τη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στον καρπό.

Ο καρπός και το λάδι τη ελιάς κατέχουν σημαντική θέση στη γεωργία και περιέχουν πολύτιμα συστατικά για τη διατροφή (προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας, μοναδικό άρωμα και γευστικό προφίλ), την παραδοσιακή φαρμακοποιία και την ιατρική [3]. Ακόμα και το ξύλο της χρησιμοποιείται στην επιπλοποιία και ως καύσιμο.

Ωστόσο, οι λόγοι αυτοί δεν είναι οι μόνοι για τους οποίους το φυτό «ελιά» κεντρίζει το ενδιαφέρον. Τα φύλλα της έχουν απασχολήσει τόσο το χώρο της φαρμακοποιίας όσο και άλλους επιστημονικούς κλάδους. Παρουσιάζουν οφέλη που προάγουν την υγεία με φυσικό και μη τοξικό τρόπο καθώς περιέχουν πολύτιμα φυσικά συστατικά όπως βιο-δραστικές ενώσεις παρουσιάζοντας μεταξύ άλλων αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντιθρομβωτικές ιδιότητες [3]. Τα φύλλα της ελιάς αποτελούν υπόλειμμα από τη συγκομιδή της ελιάς (παραπροϊόντα της ελαιοκαλλιέργειας) και συνίσταται ως πρώτη ύλη εφόσον είναι πρακτικά ανεκμετάλλευτα και δεν αξιοποιούνται σαν τρόφιμο.

2.1.2. Ιδιότητες Φύλλων Ελιάς

Τα φύλλα της ελιάς είναι πλούσια σε φυσικά αντιοξειδωτικά χάρη κυρίως στις φαινολικές ενώσεις και τα γλυκοσίδια. Συμβάλλουν στην αντι-γήρανση και την προστασία από ηλικιακά σχετιζόμενες ασθένειες, καθώς προστατεύουν τα κύτταρα από τις ελεύθερες ρίζες παρέχοντάς τους εύκολα ηλεκτρόνια. Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπερ-οξείδωση λιπιδίων, μετουσίωση και διάσπαση πρωτεϊνών, μεταλλάξεις και διάσπαση DNA, τροποποιήσεις και διάσπαση υδατανθράκων. Στους ζωντανούς οργανισμούς πραγματοποιούνται αλυσιδωτές αντιδράσεις και ο τερματισμός τους συμβαίνει είτε με αντίδραση ελευθέρων ριζών μεταξύ τους είτε με ένωση (αντιοξειδωτικό) που οδηγεί στον σχηματισμό σταθερής ρίζας [4]. Επομένως, τα αντιοξειδωτικά επισπεύδουν τον τερματισμό μειώνοντας τις ελεύθερες ρίζες.

Συστατικά των φύλλων, όπως η βιταμίνη E και η προβουκόλη, αυξάνουν την 'καλή χοληστερόλη' (HDL), εμποδίζουν την οξείδωση της LDL 'κακής χοληστερόλης', καθυστερούν την ανάπτυξη των αθηρωματικών πλακών, γεγονός που υποδηλώνει την αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών για τη θεραπεία και την πρόληψη της αθηροσκλήρωσης. Προστατεύουν την οξείδωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, αναστέλλουν την παραγωγή λιποξυγενασών και παρουσιάζουν αντι-φλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές δράσεις [5]. Συνεπώς, μειώνεται η αρτηριακή πίεση και αυξάνεται η ροή του αίματος στις στεφανιαίες αρτηρίες. Με τον τρόπο αυτό εξηγείται και η χρήση του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς ως υποτασικό φάρμακο στη «λαϊκή» ιατρική [2].

Πολλά ακόμα συστατικά των φύλλων (ελαιοευρωπαϊνή), κατέχουν ιδιότητες εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών (scavenging activity). Η αντιοξειδωτική δράση

είναι ο αμυντικός μηχανισμός των φυτών κατά των μικροοργανισμών και της ισχυρής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) [6].

Τα φλαβονοειδή (δευτερογενείς μεταβολίτες) και άλλες ενώσεις της επιδερμίδας των φύλλων είναι οι κύριες ουσίες οι οποίες ευθύνονται για την προστατευτική δράση από την υπεριώδη ακτινοβολία απορροφώντας την [7].

Φαίνεται ότι τα συστατικά του εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς μειώνουν τη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων όπως επίσης του καρκίνου και πολλών χρόνιων ασθενειών [8].

Επιπρόσθετα, το εκχύλισμα χαρακτηρίζεται από αντιμικροβιακή δράση. Φλαβονοειδή και τερπένια καταπολεμούν βακτήρια, μύκητες και ιούς, ενώ η ελαιοευρωπαΐνη και το καφεϊκό οξύ που δρουν κατά των παθογόνων μικροοργανισμών έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της ελονοσίας [9]. Τα τρι-τερπένια χρησιμοποιήθηκαν το 1997 ως το κύριο συστατικό του εμβολίου της γρίπης [10].

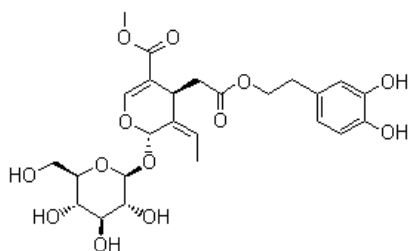
2.1.3. Συστατικά Φύλλων Ελιάς

Οι ιδιότητες των φύλλων έγκεινται τόσο στα ατομικά χαρακτηριστικά των περιεχόμενων ενώσεων όσο και στο μίγμα αυτών καθώς συνεργιστικά παρουσιάζουν αυξημένες δράσεις. Πολλές φορές προτιμάται λοιπόν, η χρήση εκχυλίσματος των φύλλων χωρίς την απομόνωση των συστατικών. Οι βασικές βιο-δραστικές ουσίες που περιέχονται στα φύλλα ελιάς είναι: η Ελαιοευρωπαΐνη (Oleuropein), η Τυροσόλη (Tyrosol), η Υδροξυτυροσόλη (Hydroxytyrosol) το Καφεϊκό Οξύ (Caffeic Acid), το Κουμαρικό Οξύ (Coumaric Acid), το Φερουλικό Οξύ (Ferulic Acid) καθώς και άλλα φλαβονοειδή [2].

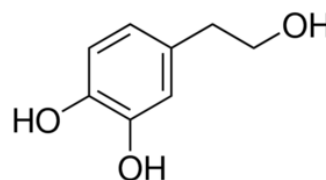
Τα δύο συστατικά που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στα φύλλα της ελιάς είναι:

- **Ελαιοευρωπαΐνη (Oleuropein):** Αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό στα φύλλα της ελιάς και είναι δευτεροταγής γλυκοζίτης (σεκοϊριδοειδές). Ευθύνεται για τις πολλές και ποικίλες δράσεις του εκχυλίσματος. Μερικές από τις ευεργετικές της ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία είναι: αντι-ισχαιμικές, αντι-οξειδωτικές, υπολιπιδαιμικές, αντι-ιικές (ακόμη και κατά του HIV), αντι-μικροβιακές, καρδιοπροστατευτικές, αντιθηρογόνες, αντιφλεγμονώδεις [11], υπο-χοληστερολαιμικές, υπογλυκαιμικές και αντι-υπερτασικές ιδιότητες. Προλαμβάνει τις καρδιακές παθήσεις προστατεύοντας την οξείδωση των μεμβρανών από λιπίδια. Επιπλέον, βελτιώνει τον μεταβολισμό των λιπιδίων για την καλύτερη αντιμετώπιση προβλημάτων παχυσαρκίας [12] και προστατεύει τα ένζυμα σε ασθενείς με καρκίνο.
- **Υδροξυτυροσόλη (Hydroxytyrosol):** Είναι κύριο παράγωγο της Ελαιοευρωπαΐνης και χαρακτηρίζεται ως φυσική, φυτο-χημική φαινόλη. Παρουσιάζει αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις και

προληπτικές ιδιότητες για τον καρκίνο (ιδιαίτερα για την πρόληψη του καρκίνου του μαστού στις γυναίκες).



Εικόνα 4: Χημική Ένωση Ελαιοευρωπαϊνης



Εικόνα 5: Χημική Ένωση Υδροxyτυροσόλης

Μερικές ακόμα σημαντικές ουσίες των φύλλων της ελιάς παρουσιάζονται παρακάτω ονομαστικά. Οι περιεκτικότητες ποικίλουν ανάλογα με την εποχή και το είδος της καλλιέργειας. Αν και η πλειοψηφία αποτελεί δευτερογενείς μεταβολίτες (φαινολικές ενώσεις, τερπένια, φλαβονοειδή, σεκοϊριδοειδή κ.α), άλλα περιεχόμενα συστατικά είναι τα σάκχαρα, οι χλωροφύλλες και τα λίπη.

- **Verbascoside**
[θεραπευτική δράση οξειδωτικής βλάβης του εγκεφάλου λόγω κατανάλωσης ηρώνης] [13]
- **Λουτεολίνη (Luteolin)** [9]
- **7-O-γλυκοσίδιο λουτεολίνης (Luteolin-7-O-glucoside)**
[αποφυγή αγγειακής επαναστένωσης λόγω αθηροσκλήρωσης μέσω αναστολής του ανώμαλου πολλαπλασιασμού των κυττάρων των αορτικών λείων μυϊκών ινών] [13]
- **4-O-γλυκοσίδιο λουτεολίνης (Luteolin 4-O-glucoside)**
- **7-γλυκοσίδιο απιγενίνης (Apigenin-7-glucoside)** [9]
[καταπολέμηση της νόσου του Αλτσχάιμερ και ασθενειών του ήπατος] [13]
- **α-τοκοφερόλη** [Το πιο δραστικό ισομερές της βιταμίνης E] [10]
- **Βανιλίνη (Vanillin)** [11]
- **Βανιλλικό Οξύ (Vanillic Acid)**
- **Ρουτίνη (Rutin)** [9]
- **Βιταμίνες E, K, A** [14]
- **Καροτενοειδή** [15]

2.1.4. Χρήσεις Εκχυλίσματος Φύλλων Ελιάς

Το εκχύλισμα φύλλων ελιάς βρίσκει ποικίλες εμπορικές εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων. Λόγω της αντιοξειδωτικής του δράσης χρησιμοποιείται ως φυτικό φάρμακο και διατροφικό συμπλήρωμα σε μορφή δισκίου ή διαλύματος, για την ενίσχυση της φυσικής άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού. Μια ακόμα χρήση του είναι η προσθήκη του ως αντιοξειδωτικό σε τρόφιμα και ποτά (πχ. Τσάι) με αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας ζωής των προϊόντων. Ως ενεργό συστατικό σε τρόφιμα αποτρέπει το σχηματισμό

αρωματικών και τοξικών ενώσεων που προκύπτουν από λιπίδια κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης. Επιπλέον, το εκχύλισμα βρίσκεται στην αγορά ως περιεχόμενο σε καλλυντικά, κρέμες, σαμπουάν, μαλακτικά και σαπούνια.

2.1.5. Μέθοδοι Απομόνωσης Συστατικών Φύλλων Ελιάς

Ποικίλες διεργασίες έχουν διερευνηθεί για την ανάκτηση των βιο-δραστικών ουσιών από τα φύλλα ελιάς. Καθώς η απόσταξη απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες, οι οποίες δεν ενδείκνυνται σε φυτικές πρώτες ύλες, η εκχύλιση καθίσταται μια κατάλληλη διεργασία για το σκοπό αυτό.

Η Εκχύλιση είναι μια φυσική διεργασία διαχωρισμού, που κάνει χρήση ενός ή περισσότερων διαλυτών στους οποίους διαλύονται εκλεκτικά ένα ή περισσότερα συστατικά του προς εκχύλιση μίγματος. Η αρχή λειτουργίας της είναι η εκμετάλλευση των χημικών διαφορών και της διαφοράς της διαλυτότητας των συστατικών.

Η πιο διαδεδομένη είναι η υγρή εκχύλιση (Soxhlet) [16] με ποικιλία διαλυτών και διάφορες παραλλαγές, όπως η υγρή εκχύλιση υπό πίεση (Pressurized liquid Extraction) [15] και η υπέρθερμη υγρή εκχύλιση [13].

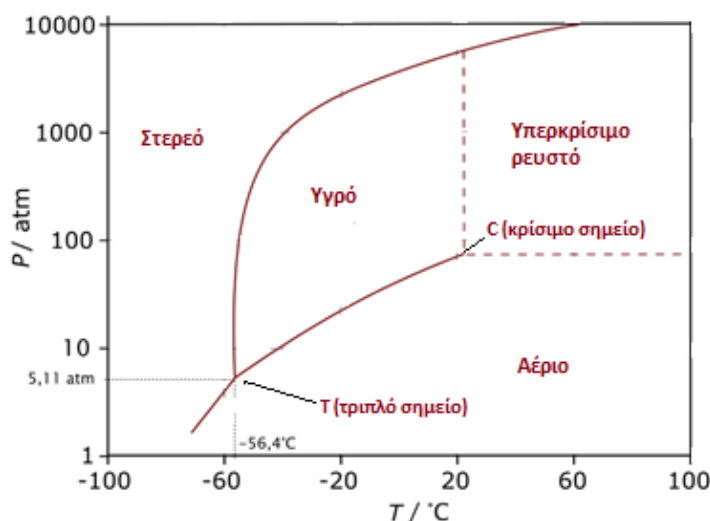
Στη βιομηχανία των τροφίμων και των φαρμάκων συχνά επιλέγεται η υγρή εκχύλιση με νερό ακολουθούμενη από σύστημα φιλτραρίσματος, για την εξασφάλιση της καθαρότητας του προϊόντος. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει τη διατήρηση των βιταμινών και των επιθυμητών στοιχείων του φύλλου για ένα ποιοτικό εκχύλισμα. Επίσης, για τη βελτίωση της απόδοσης γίνεται και χρήση μίγματος διαλυτών νερού και αλκοολών (χωρίς εξάνιο) [17].

Ωστόσο, σε ερευνητικό επίπεδο έχει μελετηθεί πληθώρα μεθόδων, πέραν της απλής εκχύλισης, που σε εργοστασιακή κλίμακα το κόστος είναι προς το παρόν υψηλό για να εφαρμοστούν. Η υγρή εκχύλιση έχει πραγματοποιηθεί σε πιλοτική κλίμακα σε οργανικούς διαλύτες διαφορετικών πολικοτήτων (πετρελαϊκός αιθέρας, διχλωρομεθάνιο, μεθανόλη, αιθανόλη, κ-εξάνιο, χλωροφόρμιο, αιθανικός αιθυλεστέρας, βουτανόλη) και σε μίγματα αυτών, για διάφορες ποικιλίες φύλλων ελιάς [9], [18]. Ακόμα, για την απομόνωση βιο-δραστικών ενώσεων από τα φύλλα έχει μελετηθεί η υδροαπόσταξη, η εκχύλιση με χρήση υπερήχων, με διαλύτες όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο, το οξικό οξύ, το υδροχλωρικό οξύ [12], η όξινη και η ενζυματική υδρόλυση [5], η εκχύλιση με μικροκύματα, η χρήση μεμβρανών και η υπερκρίσιμη εκχύλιση (SFE) με διοξείδιο του άνθρακα και συν- διαλύτες όπως το εξάνιο, το νερό, η μεθανόλη και η αιθανόλη [10], [14], [16], [15].

2.2. Υπερκρίσιμη Εκχύλιση – Supercritical Fluid Extraction (SFE)

2.2.1. Υπερκρίσιμα Ρευστά

Μια καθαρή ουσία είναι δυνατό να βρεθεί σε τρεις καταστάσεις της ύλης όπως φαίνεται στο διάγραμμα φάσης $P - T$ (Διάγραμμα 1) για το CO_2 : στερεή, υγρή και αέρια. Αυτές διαχωρίζονται από τρεις καμπύλες ισορροπίας. Στην καμπύλη εξάχνωσης συνυπάρχουν η στερεή με την αέρια φάση, στην καμπύλη τάσης ατμών ή εξάτμισης συνυπάρχει η υγρή με την αέρια φάση, ενώ στην καμπύλη τήξης η στερεή με την υγρή φάση. Στο διάγραμμα παριστάνονται επίσης δύο σημαντικά σημεία, το τριπλό και το κρίσιμο. Το πρώτο αφορά στις συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης για τις οποίες συνυπάρχουν και οι τρεις φάσεις. Το κρίσιμο σημείο βρίσκεται στο τέλος της καμπύλης εξάτμισης και πέρα από αυτό το αέριο και το υγρό συγχωνεύονται και σχηματίζεται μια ενιαία ομοιογενής φάση, η υπερκρίσιμη. Η θερμοκρασία και η πίεση της καθαρής ουσίας στο κρίσιμο σημείο ονομάζονται κρίσιμη θερμοκρασία (T_c) και κρίσιμη πίεση (P_c) [19]. Στην υπερκρίσιμη περιοχή δεν υπάρχει διάκριση μεταξύ υγρού και αερίου, ούτε μετάβαση από τη μία φάση στην άλλη. Το υπερκρίσιμο ρευστό συμπεριφέρεται σαν ένα πολύ πυκνό αέριο ή ένα ελαφρύ υγρό [20].



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα Φάσεων Διοξειδίου του Άνθρακα σε προβολή $P - T$

Ένα Υπερκρίσιμο Ρευστό είναι λοιπόν ένα ρευστό που συμπιέζεται πάνω από την κρίσιμη πίεση και θερμαίνεται πάνω από την κρίσιμη θερμοκρασία. Χρησιμοποιούνται συχνά ως διαλύτες γιατί έχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών υγρών διαλυτών. Η πιο σημαντική ιδιότητα των ρευστών αυτών είναι η διαλυτική τους ικανότητα. Σε υπερκρίσιμες συνθήκες έχουν την ικανότητα να διαλύουν ενώσεις που διαλύονται ελάχιστα ή και καθόλου όταν ο διαλύτης είναι υγρός ή αέριος. Η διαλυτική ικανότητα ενός υπερκρίσιμου ρευστού εξαρτάται από την πυκνότητα, η οποία μεταβάλλεται από τιμές που προσεγγίζουν τα αέρια έως τιμές παρόμοιες των υγρών, μόνο με μικρές αλλαγές

της πίεσης και της θερμοκρασίας [19]. Ταυτόχρονα οι διαλυμένες ουσίες μπορούν να ανακτηθούν και να κλασματωθούν από τον υπερκρίσιμο διαλύτη μεταβάλλοντας απλώς τη θερμοκρασία ή την πίεση [20].

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας είναι η ισχύς διάλυσης, λόγω του υψηλού ρυθμού μεταφοράς μάζας των επιθυμητών ουσιών από την τροφοδοσία στο διαλύτη. Το ιξώδες των υπερκρίσιμων ρευστών είναι χαμηλό και οι διαχυτότητες των διαλυμένων ουσιών σε αυτό είναι υψηλές, αντίστοιχες με αυτές των αερίων, ενώ η πυκνότητα είναι υψηλή, αντίστοιχη των υγρών. Ταυτόχρονα η επιφανειακή του τάση είναι σχεδόν μηδενική. Κατά συνέπεια, το υπερκρίσιμο ρευστό διαπερνά εύκολα πορώδη ή ινώδη στερεά. [19]

Τα πιο συνήθη υπερκρίσιμα ρευστά που χρησιμοποιούνται ως διαλύτες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα με τις κρίσιμες τιμές τους.

Πίνακας 1: Κρίσιμες Ιδιότητες Διαλυτών [21]

Διαλύτης	T _c (°C)	P _c (bar)
Διοξείδιο του Άνθρακα (CO ₂)	31.04	73.81
Νερό (H ₂ O)	373.99	220.64
Μεθάνιο (CH ₄)	-82.57	46.04
Αιθάνιο (C ₂ H ₆)	32.18	48.71
Προπάνιο (C ₃ H ₈)	96.67	42.49
κ – εξάνιο (C ₆ H ₁₄)	234.15	30.12
Μεθανόλη (CH ₃ OH)	239.49	80.92
Αιθανόλη (C ₂ H ₅ OH)	240.77	61.37

2.2.2. Μέθοδος Λειτουργίας Υπερκρίσιμης Εκχύλισης

Η διαδικασία της SFE αποτελείται από δύο βασικά στάδια που είναι διακριτά στο Διάγραμμα 2:

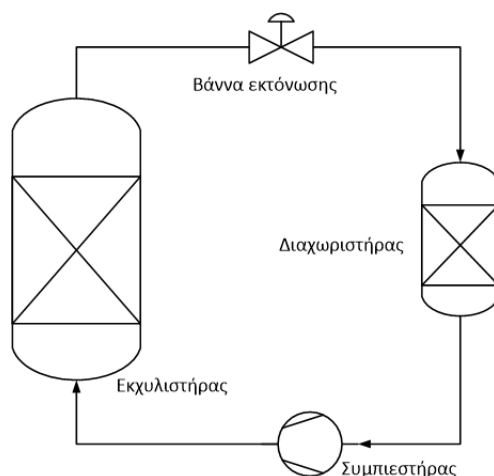
A) Εκχύλιση

Η τροφοδοσία εισέρχεται στον Εκχυλιστήρα. Ο διαλύτης αφού μεταβεί στην υπερκρίσιμη κατάσταση μέσω συμπιεστή και εναλλακτών, ώστε να έχει τις κατάλληλες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας, διέρχεται από τον εκχυλιστήρα.

B) Διαχωρισμός

Στη συνέχεια, ο διαλύτης που πλέον περιέχει τις διαλυμένες ουσίες της τροφοδοσίας περνά στον διαχωριστήρα. Με μείωση της πίεσης, μειώνεται η διαλυτική ικανότητα του υπερκρίσιμου ρευστού και πραγματοποιείται ο διαχωρισμός ή η κλασμάτωση εάν υπάρχουν περισσότεροι του ενός διαχωριστήρες σε σειρά [19].

Ο διαλύτης συνήθως ανα-κυκλοφορεί και η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως εξάντλησης του ελαίου της τροφοδοσίας.



Διάγραμμα 2: Απλοποιημένο Διάγραμμα Ροής της Διεργασίας Υπερκρίσιμης Εκχύλισης

2.2.3. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα Διεργασίας

Η SFE είναι μια εναλλακτική τεχνολογία για την οποία παρουσιάζεται αυξημένο ενδιαφέρον εδώ και αρκετά χρόνια. Καθίσταται ένας αποτελεσματικός και φιλικός προς το περιβάλλον τρόπος εκχύλισης που εκμεταλλεύεται την υψηλή διαλυτική ικανότητα των υπερκρίσιμων ρευστών [22]. Μεταξύ άλλων βρίσκει εφαρμογή και στην ανάκτηση ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας που υπάρχουν σε μικρές ποσότητες σε φυσικές πρώτες ύλες. Ποικίλες ενώσεις μπορούν να διαχωριστούν από στερεά ή από υγρά με εκχύλιση με έναν υπερκρίσιμο διαλύτη. Οι συνήθεις διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι μη τοξικοί. Η υπερκρίσιμη εκχύλιση παρουσιάζει εκλεκτικότητα, ταχύτητα, αποδοτικότητα και χαμηλή κατανάλωση ενέργειας και ποσότητας διαλύτη συγκριτικά με άλλες εκχυλίσσεις. Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα ευέλικτη καθώς υπάρχει δυνατότητα αλλαγής των συνθηκών λειτουργίας και συνεχής μεταβολή των ιδιοτήτων του διαλύτη για τη διευκόλυνση της ανάκτησης συγκεκριμένων ενώσεων αλλά και την κλασματοποίηση του εκχυλίσματος. Ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημά της είναι ότι το μοναδικό προφίλ του αρώματος των ελαίων διατηρείται και οι πτητικές αρωματικές ενώσεις δεν χάνονται κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, το οποίο είναι σημαντικό για φυτικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων ή συστατικά καλλυντικών.

Μερικά σημεία στα οποία φαίνεται να υστερεί η διεργασία της υπερκρίσιμης εκχύλισης είναι το μεγάλο πάγιο κόστος, η υψηλή πίεση που απαιτείται και η ασυνεχής ή ημι-συνεχής λειτουργία. Βέβαια, τα πλεονεκτήματα της SFE υπερτερούν οπότε και χρησιμοποιείται και μελετάται περαιτέρω.

2.2.4. Εφαρμογές Υπερκρίσιμης Εκχύλισης σε μεγάλη κλίμακα

Το υψηλό κόστος εγκατάστασης μιας μονάδας υπερκρίσιμης εκχύλισης δεν είχε επιτρέψει για αρκετά χρόνια τη διάδοσή της σε βιομηχανικό επίπεδο. Πλέον στον κλάδο των τροφίμων, η διεργασία αυτή βρίσκει χρήση σε αρκετές εγκαταστάσεις και παρακάτω αναγράφονται ονομαστικά μονάδες υπερκρίσιμης εκχύλισης με διαλύτη το CO₂ [23]:

- Αποκαφεϊνοποίηση του καφέ (Η.Π.Α., Γερμανία, Ιταλία)
- Αποκαφεϊνοποίηση του τσαγιού (Γερμανία)
- Απομάκρυνση Λιπαρών Οξέων από χρησιμοποιημένο κριθάρι
- Απομόνωση ελαίου Βιταμίνης Ε, φυτοστερόλης, μεθυλεστέρα λιπαρών οξέων, ελαίου πιπερόριζας (Κίνα)
- Εκχύλιση Νικοτίνης (Η.Π.Α.)
- Παραγωγή φυσικού εντομοκτόνου / παρασιτοκτόνου από εκχύλισμα Πύρεθρου (Αγγλία, Γερμανία, Η.Π.Α.)
- Εκχύλιση Λυκίσκου στη ζυθοποιία (Αυστραλία, Αγγλία, Γερμανία)
- Παραγωγή μπαχαρικών και μυρωδικών, αρωμάτων, φυσικών προϊόντων και χρωμάτων (Καναδάς, Ιαπωνία, Η.Π.Α.)

2.2.5. Διαλύτες

Διάφοροι διαλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί στη SFE, όπως αιθάνιο, προπάνιο, αιθυλένιο, νερό, κυκλοεξάνιο κ.α. Πολλές φορές γίνεται χρήση μίγματος διαλυτών για την επίτευξη μεγαλύτερης απόδοσης ή επιλεκτικής εκχύλισης. Η προσθήκη ενός συν-διαλύτη αλλάζει την πολικότητα του μίγματος οπότε αυξάνεται η διαλυτότητα σε συγκεκριμένα συστατικά. Στην εργασία αυτή, ο υπερκρίσιμος διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι το διοξείδιο του άνθρακα και οι συν – διαλύτες που δοκιμάζονται είναι η αιθανόλη και μίγμα ιοντικού υγρού με αιθανόλη.

Διοξείδιο του άνθρακα

Ένας πολύ χρήσιμος διαλύτης για την υπερκρίσιμη εκχύλιση, ιδιαίτερα στην επεξεργασία τροφίμων, είναι το υπερκρίσιμο Διοξείδιο του Άνθρακα (SC – CO₂). Η ουσία αυτή είναι μη τοξική, μη εύφλεκτη, πλήρως ανακτήσιμη, αδρανής, δεν είναι ρυπαντής, είναι λιγότερο ακριβή σε σύγκριση με συμβατικούς διαλύτες, άφθονη και εύκολα διαθέσιμη. Όπως ήδη αναφέρθηκε, έχει κρίσιμο σημείο θερμοκρασίας $T_c = 31.04\text{ }^{\circ}\text{C}$ και πίεσης $P_c = 73.81\text{ bar}$, συνθήκες στις οποίες είναι εύκολη και ασφαλής η λειτουργία μιας διεργασίας. Καθίσταται λοιπόν ιδανικός διαλύτης για την εκχύλιση πτητικών και θερμικά ασταθών ενώσεων. Η κρίσιμη πυκνότητα του είναι 0.460 g/cm^3 [19]. Στην υπερκρίσιμη φάση, το CO₂ μπορεί να διεισδύσει το στερεό δείγμα ταχύτερα από τους υγρούς διαλύτες λόγω της

μεγαλύτερης διαχυτικής του ικανότητας αλλά και να απομακρυνθεί πλήρως σαν αέριο από το τελικό εκχύλισμα με μια απλή εκτόνωση οδηγώντας σε προϊόν απαλλαγμένο από διαλύτη.

Λαμβάνοντας υπόψη τις ανησυχίες για την υπερθέρμανση του πλανήτη και τις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου, η χρήση SC-CO₂ σε εργοστάσια μεγάλης κλίμακας αποτελεί μια περιβαλλοντικά ασφαλή επιλογή, καθώς το διοξείδιο του άνθρακα που δημιουργείται από άλλες βιομηχανίες δεν απελευθερώνεται απευθείας στην ατμόσφαιρα αλλά χρησιμοποιείται σε νέες βιομηχανικές δραστηριότητες.

Επιπρόσθετα, το CO₂ εξαλείφει την ανάγκη οργανικών διαλυτών αλλά και άλλων επιβλαβών ουσιών, όπως το εξάνιο που χρησιμοποιείται συχνά στην παρασκευή ελαίων. Κατά αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η επιβάρυνση του περιβάλλοντος και της ανθρώπινης υγείας. Έναντι του εξανίου, το CO₂ παρουσιάζει παράλληλα βελτίωση της ροής, επιτυγχάνοντας μεγαλύτερη διαχυτότητα [24]. Το SC – CO₂ τείνει να είναι επιλεκτικό σε ενώσεις μοριακού βάρους μικρότερου των 250 g/mol και σε ασθενώς πολικές ομάδες όπως λιπίδια, χοληστερόλη, αλδεΐδες, αιθέρες, εστέρες και κετόνες. Αντίθετα, ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους (>400 g/mol) ή πολικές ομάδες όπως σάκχαρα, πολυσακχαρίτες, αμινοξέα, πρωτεΐνες, γλυκοσίδια και ανόργανα άλατα είναι σχετικά αδιάλυτα στο CO₂. Τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται είναι ποιοτικά αναβαθμισμένα και ασφαλή, χωρίς τοξικές προσμίξεις, χημική ή θερμική αλλοίωση καθώς δεν χρειάζεται και να υποβληθούν σε μεταγενέστερη επεξεργασία των διαλυμένων ουσιών για την εξάλειψη του διαλύτη, γεγονός που μειώνει και το λειτουργικό κόστος της διεργασίας [19].

Συν-διαλύτης Αιθανόλη

Το διοξείδιο του άνθρακα είναι μία μη πολική ένωση και για αυτό αποτελεί ένα καλό διαλύτη για μη πολικά συστατικά, όπως υδρογονάνθρακες και αιθέρια έλαια, ενώ διαθέτει χαμηλή χημική συγγένεια με πολικές ενώσεις. Είναι, λοιπόν, αναγκαία η προσθήκη συν-διαλύτη στην υπερκρίσιμη εκχύλιση, για την αύξηση της αποδοτικότητας και την παραλαβή εκχυλίσματος πλουσιότερου σε πολικές ενώσεις (βιο-δραστικές). Η προσθήκη ενός συν-διαλύτη αυξάνει την εκλεκτικότητα και τη διαλυτότητα των επιθυμητών ουσιών στον αρχικό διαλύτη, με φυσικές αλληλεπιδράσεις με το διαλύτη (αύξηση της πυκνότητας) ή με χημικές αλληλεπιδράσεις με την προς διάλυση ουσία (δεσμοί υδρογόνου) [19]. Δεν πρέπει όμως να παραβλέπεται το γεγονός ότι με την προσθήκη συν-διαλύτη απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο για την παραλαβή ξηρού, καθαρού εκχυλίσματος. Η απομάκρυνση του συν-διαλύτη απαιτεί εξάτμιση υπό κενό παρόμοια με τη συμβατική εκχύλιση με διαλύτη [24], αν και η ποσότητα του συν-διαλύτη είναι μικρότερη.

Ο συν-διαλύτης αποτελεί συνήθως μικρό ποσοστό της συνολικής ροής του διαλύτη και είναι πλήρως ή μερικώς αναμίξιμος με αυτόν. Είναι δυνατό να

χρησιμοποιηθούν συν-διαλύτες που σε συνθήκες περιβάλλοντος είναι είτε υγροί είτε αέριοι.

Διάφοροι συν-διαλύτες έχουν ερευνηθεί και χρησιμοποιηθεί για τη συγκεκριμένη λειτουργία. Στη βιομηχανία των τροφίμων συνήθως επιλέγονται διάφορα αέρια, αιθανόλη ή νερό. Η Αιθανόλη είναι πολική ένωση οπότε η προσθήκη της στο SC-CO₂ αυξάνει τη διαλυτότητα των πολικών συστατικών του δείγματος, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα ανάκτησης φλαβονοειδών, ελαιοευρωπαϊνης και πολικών φωσφολιπιδίων από τις ελαιούχες επιφάνειες, κάτι που δεν είναι εύκολα δυνατό με το καθαρό SC-CO₂.

Ωστόσο, συγκριτικά με άλλους συν-διαλύτες, όπως η μεθανόλη, η αποτελεσματικότητα της αιθανόλης στη SFE έχει βρεθεί μικρότερη όσον αφορά στην περιεκτικότητα σε ελαιοευρωπαϊνη [8] και η τιμή της στην αγορά είναι γενικά υψηλή.

Οι λόγοι για τους οποίους επιλέγεται είναι ότι συνιστάται για τη χαμηλή τοξικότητα, είναι περιβαλλοντικά ασφαλής ουσία και κατάλληλη για προϊόντα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Επιπλέον, δεδομένου ότι δεν είναι επιβλαβής έως κάποια συγκέντρωση, υπάρχουν περιπτώσεις όπου η απομάκρυνσή της από το τελικό προϊόν δεν είναι αναγκαία.

Συν-διαλύτης Ιοντικό Υγρό

Τα Ιοντικά Υγρά είναι οργανικά άλατα που βρίσκονται στην υγρή φάση σε θερμοκρασία δωματίου. Αποτελούνται από μεγάλα οργανικά κατιόντα και ανόργανα ή οργανικά ανιόντα. Λόγω του χαμηλού σημείου τήξεως και της αμελητέας τάσης ατμών που διαθέτουν παραμένουν υγρά σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών (μεγαλύτερο των 300°C), γεγονός που τα καθιστά καλούς διαλύτες σε χημικές και φυσικές διεργασίες. Επίσης παρουσιάζουν υψηλή χημική και θερμική σταθερότητα, ανακυκλώνονται, και υπάρχει η δυνατότητα ρύθμισης των ιδιοτήτων τους με την κατάλληλη επιλογή ανιόντος και κατιόντος. Το εύρος των ουσιών που διαλύουν είναι μεγάλο, όπως πολικές οργανικές ενώσεις, αρωματικούς υδρογονάνθρακες, μεταλλικούς καταλύτες κ.α. [25]. Οπότε, η σωστή επιλογή ενός ιοντικού υγρού μπορεί να βελτιώσει την απόδοση και να χαμηλώσει το κόστος μιας διεργασίας.

Βέβαια, ο λόγος που έχει ωθήσει μεγάλο μέρος της έρευνας προς τα ιοντικά υγρά είναι πως είναι διαλύτες φιλικοί προς το περιβάλλον. Παρά την κάποια τοξικότητα που παρουσιάζουν ορισμένα ιοντικά υγρά θεωρούνται πράσινοι διαλύτες, διότι σε αντίθεση με τους οργανικούς δεν είναι καθόλου πτητικά ή εύφλεκτα, δεν υπάρχει δυνατότητα ατμοσφαιρικής ρύπανσης ή ανάφλεξης [26] και είναι βιοαποικοδομήσιμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ιοντικά υγρά παρουσιάζουν υψηλό ιξώδες. Για τη μείωσή του, χρησιμοποιείται μίγμα αιθανόλης και ιοντικού υγρού ως συν-διαλύτης στην Υ.Ε.

Οι σημαντικές ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των ιοντικών υγρών παρουσιάζονται εν συντομία παρακάτω [25], [27]:

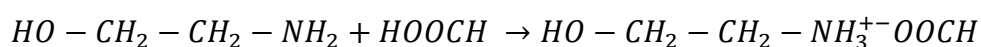
- Αμελητέα τάση ατμών
- Δομές υγρών κρυστάλλων
- Μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος υγρής φάσης
- Διαλυτότητα στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες
- Υψηλή θερμική και ηλεκτροχημική σταθερότητα
- Υψηλή θερμοχωρητικότητα
- Ηλεκτρική αγωγιμότητα
- Υψηλό ιξώδες
- Μεγάλο εύρος πολικότητας
- Καλή διαλυτική ικανότητα
- Ευελιξία στο σχεδιασμό ιοντικού υγρού με επιθυμητές ιδιότητες
- Ανακτήσιμα και Επαναχρησιμοποιήσιμα
- Υψηλό κόστος

Τα ιοντικά υγρά τείνουν να αντικαταστήσουν τους συμβατικούς διαλύτες σε υγρές εκχυλίσσεις, αφού η χαμηλή τάση ατμών τους επιτρέπει να διαχωριστούν από το τελικό προϊόν με απόσταξη χαμηλής πίεσης, εξοικονομώντας ταυτόχρονα ενέργεια. Άλλες εφαρμογές των ιοντικών υγρών περιλαμβάνουν τη χρήση τους στη στατική φάση αέριας – υγρής χρωματογραφίας, στην αποθείωση καυσίμου diesel και ως στοιχεία ηλεκτροχημικών συσκευών [28].

Το πρώτο ιοντικό υγρό που ανακαλύφθηκε, το 1914 είναι το νιτρικό αιθυλαμμώνιο με σημείο τήξης 12°C, ωστόσο το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στράφηκε σε αυτά πολύ αργότερα (2001-).

Το ιοντικό υγρό που επιλέγεται για την απομόνωση βιο-δραστικών ουσιών από τα φύλλα ελιάς είναι το 2-HydroxyEthylAmmonium Formate (2-HEAF). Το 2 – HEAF, είναι ισο-γραμμομοριακό μίγμα αιθανολαμίνης και φορμικού οξέος και παρουσιάζει θερμοκρασιακή σταθερότητα μέχρι 150°C. Λόγω της μεγάλης πολικότητας του, το 2-HEAF είναι ικανό να διαλύσει πολικά συστατικά, ανόργανα άλατα και πολυμερή [28]. Όσον αφορά στις αντιοξειδωτικές ουσίες, η διαλυτότητά τους είναι μεγαλύτερη στο ιοντικό υγρό 2 – HEAF από ότι σε συμβατικούς διαλύτες (π.χ. πεντανόλη, οξικός μεθυλεστέρας) [29].

Η σύνθεσή του αποτελεί μια απλή εξώθερμη αντίδραση οξέος – βάσης αναλογίας 1:1, μεταξύ Αιθανολαμίνης (MEA) και Φορμικού οξέος (FA). Ένα υδρογόνο (H) από το φορμικό οξύ συνδέεται με ένα άζωτο (N) σχηματίζοντας ιοντικό δεσμό, όπως δείχνει η παρακάτω εξίσωση:



Πίνακας 2: Φυσικά Χαρακτηριστικά ιοντικού υγρού 2 - HEAF [28]

Πυκνότητα	1.204 g / cm ³
Δείκτης Διάθλασης	n _D = 1.4772 (στους 25 °C)
Ιξώδες	η = 105 cP (στους 25 °C)
Αγωγιμότητα	σ = 3.3 mS / cm (στους 25 °C)
Αποσύνθεση	~ 150 °C
Θερμοκρασία τάσης ατμών	2.2 · 10 ⁻² Torr
Σημείο τήξης	-82 °C

2.3. Χημικές Ιδιότητες Εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται από τα φύλλα ελιάς εμφανίζουν διάφορες θετικές δράσεις ως προς τον ανθρώπινο οργανισμό όπως έχει ήδη αναφερθεί. Στην εργασία αυτή έμφαση δίνεται στην αντιοξειδωτική τους δράση και το ολικό φαινολικό τους περιεχόμενο.

2.3.1. Αντιοξειδωτική Δράση

Οι ελεύθερες ρίζες (free radical) δημιουργούνται εξαιτίας του οξυγόνου και είναι άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Τα δραστικά αυτά μόρια, άλλοτε είναι χρήσιμα στις λειτουργίες του οργανισμού, άλλοτε όμως προκειμένου να εξισορροπηθούν προκαλούν βλάβες οξειδώνοντας γειτονικά μόρια μεγάλης σημασίας όπως οι πρωτεΐνες και το DNA. Στην οξείδωση οφείλεται η γήρανση των ζωντανών οργανισμών και η μικρή διάρκεια ζωής των τροφίμων αλλά και πολλών ακόμα χημικών προϊόντων όπως τα πολυμερή. Η αποσύνθεση των μορίων με αυτόν τον τρόπο μπορεί να προκαλέσει ακόμα πολλές ασθένειες και νόσους (π.χ. καρκίνος). Επιπρόσθετα, η οξείδωση των λιπιδίων στα τρόφιμα είναι υπεύθυνη για το «τάγγισμά» τους (αλλοίωση γεύσης, οσμής κτλ) και ανεπιθύμητων χημικών ενώσεων που μπορεί να είναι επιβλαβή για την υγεία [30].

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την τάση να πολλαπλασιάζονται μέσω μηχανισμών διάδοσης και σπάνια καταλήγουν σε αντιδράσεις τερματισμού. Η δημιουργία τους μπορεί να προκληθεί είτε από φυσιολογικές διαδικασίες ενός οργανισμού ή από εξωτερικές πηγές.

Για την καταπολέμηση της οξείδωσης στα τρόφιμα χρησιμοποιούνται συσκευασίες υπό κενό ή υπό αδρανές αέριο για την απουσία οξυγόνου. Επίσης, η ψύξη ή η κατάψυξη μπορεί να μειώσει την οξείδωση. Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτοί δεν είναι πάντα πρακτικοί και οικονομικοί, διότι ίχνη οξυγόνου αρκούν για να ξεκινήσει η διαδικασία της οξείδωσης [31]. Ως εκ τούτου, η χρήση αντιοξειδωτικών φαίνεται να είναι η ιδανική λύση.

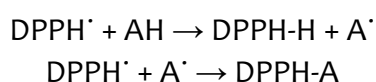
Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που καθυστερούν σημαντικά ή αποτρέπουν την οξείδωση. Αποτελούν σταθερές ενώσεις που είτε παρεμποδίζουν παράγοντες που ευνοούν τη διάδοση των ριζών, είτε τις οδηγούν σε αντιδράσεις τερματισμού. Ταυτόχρονα, είναι δυνατόν η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού (π.χ. της βιταμίνης C) να συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού (π.χ. της τοκοφερόλης). Στην περίπτωση αυτή παρουσιάζεται συνεργιστική δράση των δύο αντιοξειδωτικών [32].

Ενδογενή αντιοξειδωτικά παράγονται από τον οργανισμό, όμως δεν είναι αρκετά ώστε να καλύψουν τις απαραίτητες ανάγκες του. Άλλες πηγές προέλευσης είναι οι προσλαμβανόμενες τροφές (φυσικά) ή η λήψη συνθετικών αντιοξειδωτικών. Τρόφιμα που περιλαμβάνουν αυτές τις ουσίες είναι τα φρούτα, το κρέας, τα φυτικά εκχυλίσματα κ.α. Σχετικά με τα συνθετικά, τα πιο διαδεδομένα είναι τα BHA (Βουτυλική Υδροξυανισόλη), BHT (Βουτυλικό Υδροξυτολουόλιο) και PC (Γαλλικός Προπυλεστέρας).

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά υπερτερούν έναντι των συνθετικών στον κλάδο των τροφίμων και των φαρμάκων. Για τα συνθετικά υπάρχουν ενδείξεις τοξικότητας και ο οργανισμός ενεργοποιεί αμυντικούς μηχανισμούς απέναντι σε αυτά.

Μέθοδος Ανάλυσης

Η αντιοξειδωτική δράση συνήθως ανιχνεύεται με φασματομετρικές μεθόδους. Μία από αυτές είναι η μέθοδος DPPH. Η ουσία 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) είναι μια ελεύθερη ρίζα αζώτου η οποία ανάγεται σε 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (δηλαδή αδρανοποιείται) παρουσία αντιοξειδωτικής ένωσης [16]. Το χρώμα του διαλύματος DPPH είναι ιώδες. Με την προσθήκη σε αυτό ενός αντιοξειδωτικού, οι ελεύθερες ρίζες απορροφούν τα ηλεκτρόνια και το χρώμα αυτό σταδιακά χάνεται. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα του αντιοξειδωτικού να αντιδρά με την ρίζα του DPPH είτε δίνοντάς της ένα υδρογόνο είτε με το να δεσμεύεται πάνω σε αυτήν:



Επομένως, η μεταβολή της απορρόφησης του διαλύματος της ρίζας DPPH με μεθανόλη, μετά την προσθήκη του αντιοξειδωτικού προσδιορίζεται με φωτόμετρο στα 515 nm [30]. Ουσιαστικά, μετριέται η ποσότητα του δείγματος που απαιτείται για τη μείωση της αρχικής συγκέντρωσης της ρίζας κατά 50% (δείκτης IC₅₀). Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀, τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του δείγματος.

2.3.2. Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο

Η ποιότητα του εκχυλίσματος αντικατοπτρίζεται και στο σύνολο των φαινολών που περιέχει. Άλλωστε είναι γνωστό πως και η ποιότητα του ελαιολάδου εξετάζεται ως προς το περιεχόμενο των πολυφαινολών του. Παράλληλα, η

ανάλυση του ολικού φαινολικού περιεχομένου αποτελεί και μια ένδειξη για την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

Οι φαινόλες (π.χ. υδροξυτυροσόλη, ελαιοευρωπαϊνή) πέραν της αντιοξειδωτικής δράσης βοηθούν και στην καταπολέμηση καρδιακών παθήσεων και συμβάλλουν συνολικά στην υγεία των οργανισμών με διάφορους τρόπους.

Μέθοδος Ανάλυσης

Η μέθοδος Folin – Ciocalteu προσδιορίζει το ολικό φαινολικό περιεχόμενο που περιέχεται στα εκχυλίσματα, καθώς ανιχνεύει το σύνολο των -OH μέσα σε ένα διάλυμα. Το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu οξειδώνει τις φαινόλες, ενώ το ίδιο ανάγεται σχηματίζοντας ένα μπλε σύμπλοκο (φωσφοβολφραμικού φωσφορομολυβδαίνιου) το οποίο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με φασματοφωτομετρία ορατού μήκους κύματος [33]. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε αλκαλικό περιβάλλον και η συγκέντρωση εκφράζεται σε ισοδύναμη συγκέντρωση γαλλικού οξέος.

2.4. Μοντελοποίηση Υπερκρίσιμης Εκχύλισης

Η μελέτη της υπερκρίσιμης εκχύλισης ολοκληρώνεται με την περιγραφή των πειραματικών δεδομένων μέσω μαθηματικών μοντέλων. Γενικά έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι μοντέλων, τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε: (α) εμπειρικά μοντέλα, (β) μοντέλα που βασίζονται στην αναλογία μεταφοράς θερμότητας και (γ) μοντέλα που βασίζονται στα ισοζύγια μάζας [34]. Στη συγκεκριμένη εργασία έμφαση δίνεται στην τελευταία κατηγορία μοντέλων που θεωρούνται και τα πιο κατάλληλα καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κλιμάκωση μεγέθους της διεργασίας.

2.4.1. Sulaiman (2013)

Το μοντέλο του Sulaiman [35] είναι ένα κινητικό μοντέλο μεταφοράς μάζας πρώτης τάξης και σύμφωνα με αυτό θεωρείται ότι εφόσον δε λαμβάνει χώρα κάποια χημική αντίδραση μεταξύ του εκχυλίσματος και του διαλύτη, ο κύριος μηχανισμός που ελέγχει το ρυθμό της εκχύλισης είναι η μεταφορά μάζας του εκχυλίσματος από τη φυτική πρώτη ύλη στο διαλύτη. Οι κινητικοί μηχανισμοί της εκχύλισης στερεού – υγρού εξαρτώνται από τη φύση του ελαίου και του διαλύτη, τη θερμοκρασία της διεργασίας, το μέγεθος των σωματιδίων της πρώτης ύλης και τον χρόνο εκχύλισης.

Ο ρυθμός μεταφοράς μάζας εκφράζεται ως εξής:

$$\frac{dW_A}{dt} = k A (C_{Ai} - C_A) \quad (A1)$$

Όπου,

$\frac{dW_A}{dt}$: ο ρυθμός μεταφοράς μάζας (g/s)

C_{Ai} : η συγκέντρωση του ελαίου στο διαλύτη στην ισορροπία (g/m³)

C_A : η συγκέντρωση του ελαίου στο διαλύτη για κάθε χρονική στιγμή t (g/m³)

k : ο συντελεστής μεταφοράς μάζας (m/s)

A : το εμβαδόν της επιφάνειας μεταφοράς μάζας (m²)

t : χρόνος εκχύλισης (s)

Ο όγκος της κλίνης θεωρείται σταθερός. Οπότε:

$$\frac{dW_A}{dt} = k \frac{A}{V} (W_{Ai} - W_A) \quad (A2)$$

$$\frac{dW_A}{dt} = k a (W_{Ai} - W_A) \quad (A3)$$

Όπου,

W_A : μάζα του ελαίου στον διαλύτη (g)

V : ο όγκος του εκχυλιστήρα (m³)

ka : ο ογκομετρικός συντελεστής μεταφοράς μάζας (s⁻¹)

Με την παραδοχή ότι ο διαλύτης στην είσοδό του στον εκχυλιστήρα είναι καθαρός και δεν περιέχει καθόλου έλαιο από την πρώτη ύλη ($W_A=0$), ολοκληρώνεται η σχέση (A3):

$$W_A = W_{Ai}[1 - \exp(-kat)] \quad (A4)$$

Η (A4) μπορεί να εκφραστεί και ως προς την απόδοση της διεργασίας:

$$e = e_i[1 - \exp^{-kat}] \quad (A5)$$

Όπου,

e : η απόδοση του ελαίου κάθε χρονική στιγμή (kg ελαίου/kg τροφοδοσίας)

e_i : η απόδοση του ελαίου στο τέλος της εκχύλισης (kg ελαίου/kg τροφοδοσίας)

Η επίλυση των μαθηματικών εξισώσεων γίνεται με βάση τη συνάρτηση ελαχιστοποίησης (A6) για τον άρτιο σχηματισμό της καμπύλης εξέλιξης της απόδοσης.

$$\left\{ \sum \frac{((e_{calc} - e_{exp})^2)}{n - 1} \right\}^{0.5} \quad (A6)$$

Όπου,

e_{calc} : η υπολογισμένη τιμή της απόδοσης από το μοντέλο

e_{exp} : η πειραματική τιμή της απόδοσης

n : ο αριθμός των πειραματικών σημείων

Για την εύρεση της επιθυμητής καμπύλης λαμβάνεται η τιμή e_i , ως η μέγιστη συγκέντρωση διαλυμένης ουσίας που μπορεί να εκχυλιστεί) και ελαχιστοποιείται η σχέση (A6).

2.4.2. So & MacDonald (1986)

Το μοντέλο που ανέπτυξαν οι So & MacDonald [36] περιγράφει την εκχύλιση σε δύο στάδια:

(I) Πλύση: Το έλαιο που βρίσκεται ελεύθερο στην επιφάνεια του φυτού λόγω του τεμαχισμού των φύλλων απομακρύνεται μέσω του διαλύτη στα πρώτα στάδια της εκχύλισης.

(II) Διάχυση: Το υπόλοιπο έλαιο, το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό των φύλλων εκχυλίζεται μέσω διάχυσης από το στερεό προς το διαλύτη με χαμηλό ρυθμό μεταφοράς μάζας. Το στάδιο αυτό γίνεται αισθητό αφού ολοκληρωθεί η πλύση.

Η εξίσωση του μοντέλου σχετίζεται με τη συγκέντρωση του ελαίου στο διαλύτη ως συνάρτηση του χρόνου και προέρχεται από βασικές εξισώσεις που περιλαμβάνουν ισοζύγια μάζας, ισορροπία στερεού-υγρού και εκφράσεις ρυθμού μεταφοράς μάζας. Οι δύο μηχανισμοί υπολογίζονται ξεχωριστά και έπειτα αθροίζονται για να ληφθεί η τελική έκφραση για την απόδοση του ελαίου κάθε χρονική στιγμή (t):

$$Y_t = Y_e^w [1 - e^{-k_w t}] + Y_e^d [1 - e^{-k_d t}] \quad (B1)$$

Όπου,

Y_t : η απόδοση του ελαίου κάθε χρονική στιγμή (kg εκχυλίσματος/kg τροφοδοσίας)

Y_e^w : η τελική απόδοση του ελαίου λόγω της πλύσης (kg εκχυλίσματος/kg τροφοδοσίας)

Y_e^d : η τελική απόδοση του ελαίου λόγω της διάχυσης (kg εκχυλίσματος/kg τροφοδοσίας)

k_w : ο συντελεστής μεταφοράς μάζας για την πλύση (min^{-1})

k_d : ο συντελεστής μεταφοράς μάζας για τη διάχυση (min^{-1})

t : χρόνος εκχύλισης (min)

Η συνολική απόδοση του ελαίου στο τέλος της εκχύλισης

θα είναι ίση με:

$$Y_e = Y_e^w + Y_e^d \quad (\text{B2})$$

Από τις 5 παραμέτρους που πρέπει να προσδιοριστούν (Y_e , Y_e^w , Y_e^d , k_w , k_d), η τελική τιμή της απόδοσης (Y_e) προσεγγίζεται από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ η τιμή της Y_e^d υπολογίζεται από τη σχέση (B2). Επομένως, οι προσαρμόσιμες παράμετροι είναι οι Y_e^w , k_w , k_d . Σύμφωνα με το θεωρητικό υπόβαθρο ο συντελεστής μεταφοράς μάζας για τον μηχανισμό της πλύσης είναι μεγαλύτερος από εκείνον για τον μηχανισμό της διάχυσης (αργό στάδιο). Η επίλυση του μοντέλου προκύπτει από την ελαχιστοποίηση της συνάρτησης (A6).

Για τη μείωση των προσαρμόσιμων μεταβλητών, η τιμή της Y_e^w , μπορεί να τεθεί από το διάγραμμα ίση με την τιμή της απόδοσης στο τέλος του πρώτου ευθύγραμμου τμήματος. Σε αυτό το σημείο θεωρείται πως τελειώνει η πλύση, οπότε η απόδοση αυτού του σταδίου γίνεται μέγιστη.

2.4.3. Sonona (1993)

Το μοντέλο Sonona [37, 38] είναι ένα μοντέλο εμβολικής ροής και περιλαμβάνει το συντελεστή μεταφοράς μάζας του διαλύτη αλλά και της στερεάς μήτρας. Βασίζεται στην ύπαρξη τριών σταδίων:

(I) Γρήγορο στάδιο στο οποίο εκχυλίζεται το ελεύθερο στη φυτική μήτρα έλαιο, δηλαδή εκείνο που απελευθερώνεται κατά τη σχάση των κυτταρικών δομών της πρώτης ύλης. Ελέγχεται από τη διαλυτότητα και το συντελεστή μεταφοράς μάζας αέριας φάσης.

(II) Μεταβατικό στάδιο ανάμεσα στο πρώτο και το τρίτο όπου λαμβάνουν χώρα και τα δύο φαινόμενα. Το εκχυλίσσιμο έλαιο στην επιφάνεια των φύλλων σιγά – σιγά εξαντλείται και αρχίζει να κυριαρχεί η εκχύλιση από το εσωτερικό των κυττάρων.

(III) Αργό στάδιο κατά το οποίο εκχυλίζεται το παγιδευμένο εντός των σωματιδίων ποσό της διαλυμένης ουσίας (δ.ο.) καθώς ο διαλύτης εισέρχεται μέσα στη φυτική τροφοδοσία. Ελέγχεται από τη διάχυση και άρα από το συντελεστή μεταφοράς μάζας της στερεής φάσης.

Το μοντέλο Sonona βασίζεται στις εξής παραδοχές:

- Ο εκχυλιστήρας θεωρείται μια σταθερή κλίνη που είναι ομοιογενής ως προς το μέγεθος των σωματιδίων και ως προς την αρχική κατανομή του διαλύτη.
- Ο διαλύτης ρέει αξονικά με σταθερή επιφανειακή ταχύτητα U , διαπερνώντας την τροφοδοσία σε κυλινδρικό εκχυλιστήρα.
- Ο διαλύτης είναι καθαρός στην είσοδο του εκχυλιστήρα και δεν περιέχει διαλυμένες ουσίες.
- Η ροή του διαλύτη είναι εμβολική.
- Η θερμοκρασία, η πίεση, η πυκνότητα και η ροή του διαλύτη θεωρούνται σταθερές κατά μήκος της στερεάς κλίνης.
- Οι χημικές ενώσεις που εκχυλίζονται θεωρούνται ως μία μόνο ουσία.

Πριν την τελική έκφραση του μοντέλου εισάγονται ορισμένες χρήσιμες σταθερές:

- Η αδιάστατη παράμετρος μεταφοράς μάζας στη φάση του διαλύτη

$$Z = \frac{k_f a_o \rho}{\dot{q}(1 - \varepsilon) \rho_s} \quad (C1)$$

Όπου,

a_o : η ειδική διεπιφάνεια μεταφοράς μάζας μεταξύ των φάσεων (m^2/m^3)

k_f : ο συντελεστής μεταφοράς μάζας ρευστής φάσης (m/s)

ρ : η πυκνότητα του διαλύτη (kg/m^3)

\dot{q} : ο ανοιγμένος ρυθμός ροής του διαλύτη ως προς την τροφοδοσία (s^{-1}), [$\dot{q}=q/t$]

ε : το πορώδες της κλίνης

ρ_s : η πυκνότητα των σωματιδίων

- Η ειδική ποσότητα διαλύτη στο τέλος του πρώτου σταδίου (kg διαλύτη/ kg τροφοδοσίας ελεύθερης δ.ο.)

$$q_m = \frac{[x_o - x_k]}{y_r Z} \quad (C2)$$

Όπου,

x_o : η ολική συγκέντρωση της δ.ο. στο στερεό που μπορεί να εκχυλιστεί στις συνθήκες του πειράματος (kg δ.ο./ kg τροφοδοσίας ελεύθερης δ.ο.)

x_k : η ολική συγκέντρωση του δεσμευμένου μέρους της δ.ο. στο στερεό (kg δ.ο./ kg τροφοδοσίας ελεύθερης δ.ο.)

y_r : η διαλυτότητα της δ.ο. στο διαλύτη (kg δ.ο./kg διαλύτη)

- Η αδιάστατη παράμετρος μεταφοράς μάζας στη στερεά φάση

$$W = \frac{k_s a_o}{\dot{q}[1 - \varepsilon]} \quad (C3)$$

Όπου,

k_s : ο συντελεστής μεταφοράς μάζας στερεής φάσης (m/s)

- Η ειδική ποσότητα διαλύτη στο τέλος του δεύτερου σταδίου (kg διαλύτη/kg τροφοδοσίας ελεύθερης δ.ο.)

$$q_n = q_m \frac{1}{W} \ln \left\{ \frac{x_k + [x_o - x_k] \cdot \exp\left(\frac{W x_o}{y_r}\right)}{x_o} \right\} \quad (C4)$$

- Η αδιάστατη αξονική συντεταγμένη του ορίου μεταξύ του γρήγορου και του αργού σταδίου εκχύλισης

$$z_w = Z \frac{y_r}{W x_o} \ln \left\{ \frac{x_o \exp(W [q - q_m]) - x_k}{x_o - x_k} \right\} \quad (C5)$$

Όπου,

q : η ειδική ποσότητα διαλύτη που καταναλώνεται (kg διαλύτη/kg τροφοδοσίας ελεύθερης δ.ο.)

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι εξισώσεις του μοντέλου που εκφράζουν την ειδική ποσότητα εκχυλίσματος (απόδοση) σε kg δ.ο./kg τροφοδοσίας ελεύθερης δ.ο. είναι οι ακόλουθες:

$$e = \begin{cases} q \cdot y_r [1 - \exp(-Z)] & q < q_m \quad (I) \\ y_r [q - q_m \exp(z_w - Z)] & q_m \leq q < q_n \quad (II) \\ x_o - \frac{y_r}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp\left(\frac{W x_o}{y_r}\right) - 1 \right] \exp[W(q_m - q)] x_k / x_o \right\} & q \geq q_n \quad (III) \end{cases}$$

Οι ανεξάρτητες παράμετροι είναι 5 και είναι οι εξής: y_r, x_o, x_k, Z, W

Συγκεκριμένα, η διαλυτότητα (y_r) μπορεί να υπολογιστεί μέσω της κλίσης του πρώτου ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης εκχύλισης από τα πειραματικά δεδομένα, ενώ η ολική συγκέντρωση της δ.ο. (x_o) προσδιορίζεται από το πειραματικό σημείο που απεικονίζει το πέρας της εκχύλισης.

Οι υπόλοιπες μεταβλητές αποτελούν τις προσαρμόσιμες παραμέτρους και υπολογίζονται με την ελαχιστοποίηση της συνάρτησης (A6).

3. Πειραματικό Μέρος

3.1. Πρώτη Ύλη

Η φυτική πρώτη ύλη που επεξεργάστηκε ήταν τα φύλλα της ελιάς.

3.1.1. Συλλογή

Τα φύλλα συλλέχθηκαν στις 24 Νοεμβρίου 2018 από δύο δέντρα ελιάς στον Άλιμο, Αττικής. Οι Ελιές αυτές καλλιεργούνται χωρίς φυτοφάρμακα, λιπάσματα ή άλλες μη φυσικές παρεμβάσεις και ανήκουν στην ποικιλία Καλαμών. Το διάστημα Νοεμβρίου – Δεκεμβρίου είναι το ιδανικό για τη συγκομιδή της ελιάς Καλαμών.



Εικόνα 6: Φύλλα Ελιάς

3.1.2. Πλύση

Τα φύλλα αφού καθαρίζονται από κλαδιά και άλλες ακαθαρσίες (χώμα) πλένονται με τον εξής τρόπο: Δύο φορές με νερό βρύσης και μία με απιονισμένο νερό, σε λεκάνες όπως φαίνεται στην Εικόνα 7. Στη συνέχεια τοποθετούνται πάνω σε διηθητικό χαρτί για 3 – 4 ημέρες σε σκιερό μέρος ώστε να επέλθει η φυσική τους ξήρανση (Εικόνα 8). Η ξήρανση σε φούρνο και η έκθεση των φύλλων στον ήλιο αποφεύγεται για να μην χαθούν τα πτητικά συστατικά τους.



Εικόνα 7: Πλύση Φύλλων Ελιάς



Εικόνα 8: Φυσική Ξήρανση Φύλλων Ελιάς

3.1.3. Μέτρηση Υγρασίας

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της υγρασίας των φύλλων ελιάς με θέρμανση υπό κενό. Συγκεκριμένα, η υγρασία μετρήθηκε σε τρία δείγματα φύλλων ελιάς (~1.3g το καθένα) τα οποία τοποθετήθηκαν σε κάψες και στη συνέχεια στον φούρνο κενού Vacuum Oven της εταιρείας Gallenkamp (Εικόνα 9), στους 40°C – χαμηλή θερμοκρασία ώστε να μην χαθούν επιθυμητά συστατικά – για συνολική διάρκεια 24h. Η διαδικασία αυτή διήρκησε 5 ημέρες κατά τις οποίες τα φύλλα υποβλήθηκαν σε ξήρανση για 7h, 5h, 5h, 4h και 3h κάθε μέρα αντίστοιχα. Στο τέλος κάθε ημέρας τα δείγματα τοποθετούνταν σε ξηραντήρα μέχρι την επόμενη ξήρανσή τους. Η υγρασία εκφράζεται σύμφωνα με τη διαφορά βάρους των φύλλων πριν και μετά την ξήρανση.



Εικόνα 9: Φούρνος Κενού (Gallenkamp)

3.1.4. Άλεση – Κοσκίνισμα

Για την άλεση των φύλλων χρησιμοποιείται ο πολυκόφτης Moulinex® Type 276 (made in France) της Εικόνας 10. Τα φύλλα αλέθονται σε αυτό για συνολική διάρκεια 20 δευτερολέπτων.

Η κοκκομετρική ανάλυση των ελαιόφυλλων γίνεται με τη χρήση κοσκίνων δοκιμών. Τα πρότυπα κόσκινα διατάσσονται κατά μέγεθος ανοίγματος σε στήλη από το μικρότερο στη βάση έως το μεγαλύτερο στην κορυφή. Η στήλη εναποτίθεται στην τάρακτο για 10 λεπτά. Τάρακτος ονομάζεται η ηλεκτροκίνητη συσκευή για τη διαδικασία του κοσκινίσματος και το μοντέλο που χρησιμοποιείται είναι το Octagon digital Endecotts (Εικόνα 11). Οι κόκκοι που συγκρατούνται σε κάθε κόσκινο ζυγίζονται και μετατρέπονται σε % ποσοστά μάζας επί του ολικού δείγματος.

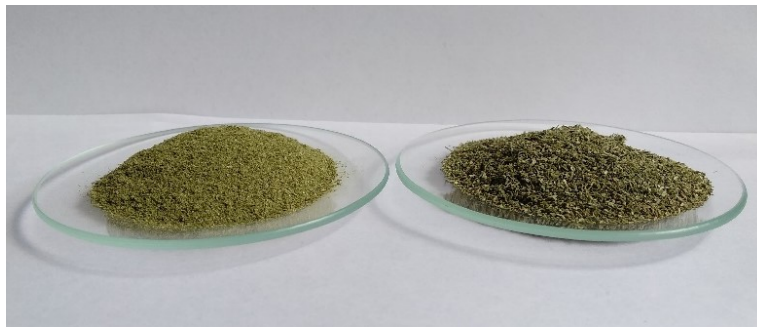
Τελικά, λαμβάνεται σκόνη φύλλων ελιάς δύο κοκκομετριών (Εικόνα 12), μία μέσης διαμέτρου $\bar{d} = 257 \mu\text{m}$ και μία $\bar{d} = 493 \mu\text{m}$. Η άλεση των φύλλων οδηγεί στη σχάση αρκετών κυτταρικών τοιχωμάτων των κυττάρων των φύλλων και έτσι στη συνέχεια μέρος του ελαίου είναι εύκολα προσβάσιμο από τον διαλύτη.



Εικόνα 11: Πολυκόφτης Moulinex



Εικόνα 10: Τάρακτος Octagon digital Endecotts



Εικόνα 12: Κοκκομετρίες φύλλων ελιάς, αριστερά $d = 257 \mu m$, δεξιά $d = 493 \mu m$

3.1.5. Αποθήκευση



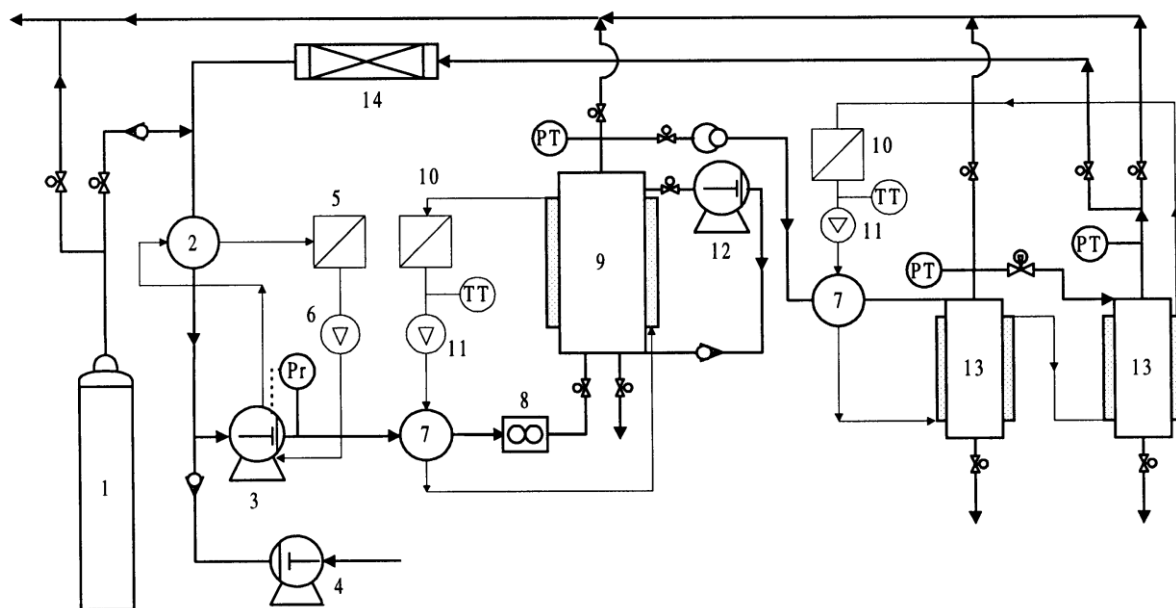
Τα φύλλα μετά την προκατεργασία αποθηκεύονται σε γυάλινα δοχεία όπως στην Εικόνα 13, σε σκιερό μέρος μέσα σε ξηραντήρα έως τη χρήση τους.

Εικόνα 13: : Δοχείο αποθήκευσης πρώτης ύλης

3.2. Υπερκρίσιμη Εκχύλιση

3.2.1. Πειραματική Διάταξη και Διαδικασία

Η συσκευή που χρησιμοποιείται είναι το μοντέλο SFE 500 της εταιρείας SEPAREX CHIMIE FINE (Γαλλία). Είναι μια εργαστηριακή μονάδα ημι-πilotικής κλίμακας υπερκρίσιμης εκχύλισης.



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα Ροής Συσκευής Υπερκρίσιμης Εκχύλισης, SFE - 500 SEPAREX [39]

Αριθμημένα Στοιχεία:

- | | |
|---------------------------------------|--------------------------------|
| 1. Φιάλη συμπιεσμένου CO ₂ | 8. Ροόμετρο |
| 2. Συμπυκνωτήρας | 9. Εκχυλιστήρας |
| 3. Αντλία CO ₂ | 10. Θερμαντικά λουτρά |
| 4. Αντλία συν – διαλύτη | 11. Αντλία θερμαντικού ρευστού |
| 5. Δοχείο ψυκτικού υγρού | 12. Αντλία ανακυκλοφορίας |
| 6. Αντλία Ψυκτικού υγρού | 13. Διαχωριστήρες |
| 7. Θερμαντήρας | 14. Φίλτρο |

Pr: Pressostat, PT: Pressure Transmitter, T: Temperature Transmitter

Η συσκευή διαθέτει 3 ασφαλιστικά πίεσης στον εκχυλιστήρα και στους δύο διαχωριστήρες, που ενεργοποιούνται όταν η πίεση ξεπεράσει περίπου τα 300 bar. Επιπλέον, οι βάνες διαθέτουν συγκεκριμένα χρώματα τα οποία σημαίνουν:

Μπλε: Αλλαγή ροής CO₂, Κόκκινο: Αποβολή CO₂ στην ατμόσφαιρα, Κίτρινο: Έξοδος περιεχομένου του εκχυλιστήρα και των διαχωριστήρων.



Εικόνα 14: Συσκευή Υπεγκρίσιμης Εκχύλισης SFE - 500 SEPAREX

Περιγραφή Διεργασίας:

Στον παρακάτω πίνακα βρίσκονται τα χαρακτηριστικά μεγέθη της διάταξης υπερκρίσιμης εκχύλισης SFE – 500:

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά Μεγέθη SFE - 500 (SEPAREX) [39], [40]

Μέγεθος	Τιμή
Εσωτερικός Όγκος κάθε Διαχωριστήρα	18 mL
Μέγιστη Πίεση Λειτουργίας	300 bar
Όγκος Δοχείου Εκχύλισης	400 mL
Εσωτερική Διάμετρος Δοχείου Εκχύλισης	5.6 cm
Όγκος Εκχυλιστήρα	500 mL
Εύρος ροής Διαλύτη	0.5 – 5 kg/h
Μέγιστη Θερμοκρασία Λειτουργίας	70 °C
Εύρος Θερμοκρασίας Ψυκτικού	-25 – 40 °C
Υλικό	316L ανοξείδωτος χάλυβας PTFE

Το διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο χρησιμοποιείται ως υπερκρίσιμος διαλύτης προμηθεύτηκε από την εταιρεία Air – Liquide, καθαρότητας 99.5% κ.β..

Μόλις η συσκευή ανοίξει με τους κατάλληλους διακόπτες χρειάζονται περίπου 20 λεπτά αναμονής προκειμένου να τεθεί σε λειτουργία. Η Υ.Ε μπορεί να ξεκινήσει όταν οι θερμοκρασίες των διαχωριστήρων και του εκχυλιστήρα είναι οι επιθυμητές, το ψυκτικό της αντλίας έχει θερμοκρασία μικρότερη των 5 °C και το ψυκτικό των διαχωριστήρων περίπου 8 °C. Ο εκχυλιστήρας και οι διαχωριστήρες διαθέτουν διπλά τοιχώματα στα οποία ρέει το ψυκτικό ή θερμαντικό ρευστό ρυθμίζοντας τη θερμοκρασία τους.

Αρχικά, 70 g φύλλων ελιάς συγκεκριμένης κοκκομετρίας εισάγονται στο κυλινδρικό δοχείο εκχύλισης μαζί με το απαραίτητο πληρωτικό υλικό, για την κάλυψη του κενού όγκου. Το δοχείο αυτό περιέχει δύο κυκλικούς πορώδεις δίσκους, στη βάση και την κορυφή του, ώστε να περνάει διαμέσου αυτού ο διαλύτης με ομοιόμορφη κατανομή. Πληρωμένο από την πρώτη ύλη τοποθετείται μέσα στον εκχυλιστήρα, ο οποίος ασφαρίζεται με ιδιαίτερη προσοχή για να αντέξει τις υψηλές πιέσεις. Στη συνέχεια, ελέγχονται οι βάνες και ορίζεται η πίεση λειτουργίας του εκχυλιστήρα από τη μπλε βάνα αντεπιστροφής πίεσης.

Με την έναρξη λειτουργίας της Υ.Ε., το CO₂ εξέρχεται από τη φιάλη και εισέρχεται στο συμπυκνωτήρα. Ο συμπυκνωτήρας αποτελεί έναν εναλλάκτη θερμότητας κατ'αντιρροή, ο οποίος με ψύξη εξασφαλίζει ότι το CO₂ θα είναι στην υγρή φάση κατά τη συμπίεση του από την αντλία μεμβράνης υψηλής πίεσης [39], της οποίας οι κεφαλές επίσης ψύχονται. Κατά αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η αποφυγή φαινομένων σπηλαίωσης. Το ψυκτικό υγρό είναι μίγμα νερού – γλυκόλης. Αφού συμπιεστεί το CO₂, θερμαίνεται με έναν ακόμα εναλλάκτη κατ'αντιρροή, με χρήση θερμού νερού, έως την υπερκρίσιμη φάση. Στο σημείο αυτό βρίσκεται και το ροόμετρο, ενώ στη συνέχεια ο διαλύτης εισέρχεται στο κάτω μέρος του εκχυλιστήρα.

Η προσθήκη συν-διαλύτη μπορεί να γίνει μέσω ειδικής αντλίας και η ανάμιξη των δύο ρευστών πραγματοποιείται πριν την είσοδο του διαλύτη στη βασική αντλία. Η ροή του κάθε ρευστού ρυθμίζεται από τα αντίστοιχα ροόμετρα.

Μόλις ο εκχυλιστήρας αποκτήσει την επιθυμητή πίεση που έχει ρυθμιστεί στην αρχή της λειτουργίας, ο διαλύτης με το διαλυμένο έλαιο εξέρχεται από αυτόν και οδηγείται προς τους διαχωριστήρες υψηλής απόδοσης τύπου κυκλώνα που είναι τοποθετημένοι σε σειρά [39]. Αξίζει να αναφερθεί ότι η συσκευή Υ.Ε. διαθέτει σύστημα ανακυκλοφορίας του διαλύτη στο δοχείο εκχύλισης, μέσω πνευματικής αντλίας, μέχρι τον κορεσμό του ως προς το έλαιο, ωστόσο η λειτουργία αυτή δε χρησιμοποιείται σε αυτή την εργασία.

Ο πρώτος διαχωριστήρας λειτουργεί σε εύρος πιέσεων 70 – 80 bar, ενώ ο δεύτερος σε 25 – 35 bar. Με τα δοχεία αυτά επιτυγχάνεται η κλασμάτωση του εκχυλίσματος και η καλύτερη δυνατή συλλογή του. Ο διαλύτης ψύχεται και το έλαιο δεν είναι πλέον διαλυτό σε αυτόν οπότε και καθιζάνει. Προτού εισέλθει η ροή στον πρώτο διαχωριστήρα περνά από έναν εναλλάκτη και θερμαίνεται. Η θέρμανση του ρεύματος χρειάζεται γιατί η απότομη εκτόνωση (Πτώση Πίεσης) που πραγματοποιείται στους διαχωριστήρες έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ξηρού πάγου με πιθανό το ενδεχόμενο να φράξουν οι σωληνώσεις. Η πίεση στον πρώτο διαχωριστήρα ρυθμίζεται μέσω βελονοειδούς ρυθμιστή στην έξοδό του, ενώ στον δεύτερο μέσω βάνας που εκτονώνει το διοξείδιο του άνθρακα στην ατμόσφαιρα.

Μετά το διαχωρισμό, το επιθυμητό εκχύλισμα λαμβάνεται σε γυάλινα φιαλίδια μέσω βανών στο κάτω μέρος των διαχωριστήρων, ενώ ο καθαρός διαλύτης είτε εξέρχεται στην ατμόσφαιρα είτε ανακυκλώνεται με τη χρήση φίλτρου. Στην εργασία αυτή δεν αξιοποιείται η ανακύκλωση του διαλύτη.

Η απόδοση της διεργασίας είναι αδύνατο να μετρηθεί από την ποσότητα του εκχυλίσματος που συλλέγεται διότι οι απώλειες λόγω προσκόλλησης στις σωληνώσεις και λόγω παράσυρσης από τον διαλύτη στην ατμόσφαιρα είναι σημαντικές. Για το λόγο αυτό, η απόδοση υπολογίζεται από την απώλεια βάρους της φυτικής πρώτης ύλης που βρίσκεται εντός του δοχείου εκχύλισης.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, η εκχύλιση διακόπτεται σε τακτά χρονικά διαστήματα προκειμένου να προσδιοριστεί η καμπύλη εκχύλισης. Το πέρας της Υ.Ε. σημαίνει όταν ελαχιστοποιείται η προαναφερθείσα διαφορά μάζας, διότι τότε δεν εκχυλίζεται πλέον καμία μετρήσιμη ποσότητα εκχυλίσματος από την τροφοδοσία. Με τον τερματισμό λειτουργίας της συσκευής, το διοξείδιο του άνθρακα εκτονώνεται σιγά – σιγά στην ατμόσφαιρα, ώστε να μην προκύψει εμφάνιση πάγου ή παράσυρση. Ταυτόχρονα λαμβάνονται οι τελευταίες ποσότητες ελαίου από τους διαχωριστήρες. Όταν η πίεση του εκχυλιστήρα φτάσει την ατμοσφαιρική, ξε-σφραγίζεται και εξέρχεται το δοχείο εκχύλισης. Αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι να σταθεροποιηθεί το βάρος του, ώστε να γίνει ο υπολογισμός της απόδοσης της διεργασίας σύμφωνα με τον τύπο:

$$e\% = \frac{\text{initial feed} - \text{final feed}}{\text{initial feed}} \cdot 100 \quad (3.1.)$$

Όπου,

Initial feed: η αρχική ποσότητα των φύλλων της ελιάς που εισέρχεται στον εκχυλιστήρα (kg)

Final feed: η ποσότητα των φύλλων που απέμεινε στον εκχυλιστήρα με το πέρας της εκχύλισης (kg)

Σημειώνεται ότι στα πειράματα με συν-διαλύτη, μόλις συμπληρωθεί ο απαραίτητος χρόνος εκχύλισης σταματά η ροή του συν-διαλύτη αλλά συνεχίζεται η ροή του CO₂, ώσπου να απομακρυνθεί ο συν-διαλύτης από το δοχείο εκχύλισης (στέγνωμα) και να μπορεί να μετρηθεί η μάζα του. Ωστόσο, στο πείραμα που χρησιμοποιήθηκε το ιοντικό υγρό, η εύρεση της απόδοσης προϋποθέτει μία επιπλέον διαδικασία. Με τη διαδικασία του στεγνώματος αποβάλλεται η αιθανόλη αλλά αρκετή ποσότητα ιοντικού υγρού παραμένει στο δοχείο εκχύλισης. Για να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του συν-διαλύτη, γίνεται εκπλύση της πρώτης σε συνθήκες περιβάλλοντος με απιονισμένο νερό, στο οποίο είναι διαλυτό το ιοντικό υγρό. Με την ήπια αυτή διαδικασία δεν χάνεται σημαντική ποσότητα της τροφοδοσίας. Ακολουθεί ξήρανση της πρώτης ύλης υπό κενό σε θερμοκρασία 40 °C για την εξάτμιση του νερού και στη συνέχεια ζύγιση για την εύρεση της απόδοσης.

Καθαρισμός Συσκευής Υ.Ε.

Με την ολοκλήρωση ενός πειράματος η συσκευή πρέπει να καθαριστεί προκειμένου να πραγματοποιηθεί επόμενο πείραμα. Οι επικαθίσεις στις σωληνώσεις είναι πολλές και για αυτό χρησιμοποιείται αιθανόλη καθαρότητας >99% (αριθμός CAS: 64-17-5, Merck KGaA). Με τη συσκευή εκτός λειτουργίας ανοίγονται οι διαχωριστήρες και προστίθενται περίπου 18 mL αιθανόλης σε κάθε έναν. Ο διαλύτης παραμένει εντός των δοχείων για 15 min. Στη συνέχεια λαμβάνονται τα υπολείμματα ελαίου διαλυμένα στην αιθανόλη. Ύστερα, αφού συλλεχθεί και αποθηκευτεί η πρώτη ύλη και πλυθεί το δοχείο εκχύλισης τοποθετείται άδειο στον εκχυλιστήρα, ενώ προστίθεται σε αυτό αρκετή ποσότητα αιθανόλης. Η συνέχεια της διαδικασίας είναι ίδια με προηγουμένως (όταν υπήρχε πρώτη ύλη). Το τέλος του καθαρισμού είναι όταν το υγρό από τους διαχωριστήρες εξέρχεται διαυγές, δηλαδή η αιθανόλη δεν περιέχει άλλο έλαιο. Βέβαια, μετά τον καθαρισμό είναι αναγκαίο το στέγνωμα της συσκευής, που σημαίνει ότι η λειτουργία της συνεχίζεται μέχρι να μην υπάρχει άλλη αιθανόλη στις σωληνώσεις και τα δοχεία. Ο αριθμός των καθαρισμών και η διάρκειά τους δεν είναι κάτι τυποποιημένο. Ειδικά για τα φύλλα της ελιάς που περιέχουν πολλά βαριά συστατικά απαιτούνται πολλοί καθαρισμοί (περίπου 5), η διάρκεια των οποίων εξαρτάται από την ποσότητα της αιθανόλης στον εκχυλιστήρα.

Προγραμματισμός Πειραμάτων Υ.Ε.

Η μελέτη της υπερκρίσιμης εκχύλισης στα φύλλα της ελιάς αποσκοπεί στην εύρεση της επίδρασης ορισμένων λειτουργικών παραμέτρων στην απόδοση της διεργασίας. Οι παράμετροι αυτοί είναι η πίεση του εκχυλιστήρα (P_{ex}), η θερμοκρασία του (T_{ex}), η κοκκομετρία της φυτικής μήτρας (φύλλα ελιάς) και η προσθήκη συνδιαλύτη.

Τα στοιχεία που παρέμειναν σταθερά σε κάθε πείραμα είναι τα παρακάτω:

Πίνακας 4: Σταθερά στοιχεία πειραμάτων Υ.Ε.

Μαζική Ροή Διαλύτη (CO_2)	2 kg/h
Πίεση 1 ^{ου} διαχωριστήρα	70 – 80 bar
Πίεση 2 ^{ου} διαχωριστήρα	20 – 30 bar
Θερμοκρασία Διαχωριστήρων	40 °C

Το κάθε πείραμα διήρκησε 255 min, δηλαδή 4 ώρες και 15 λεπτά. Τα πειράματα στα οποία δε χρησιμοποιήθηκε συν-διαλύτης, αλλά διοξείδιο του άνθρακα διακόπτονταν ανά χρονικά διαστήματα προκειμένου να βρεθεί η απώλεια βάρους της τροφοδοσίας ως προς την ποσότητα διαλύτη που έχει εισέλθει σε

αυτή. Στη χρήση συν-διαλύτη η διακοπή του πειράματος δεν είναι εφικτή καθώς το δοχείο του εκχυλιστήρα περιλαμβάνει τον διαλύτη ο οποίος δε μπορεί να αφαιρεθεί παρά μόνο στο τέλος της όλης διαδικασίας. Επομένως, η απώλεια βάρους δε μπορεί να βρεθεί μέσω ζύγισης. Το αποτέλεσμα που λαμβάνεται στα πειράματα αυτά είναι η συνολική απόδοση της διεργασίας.

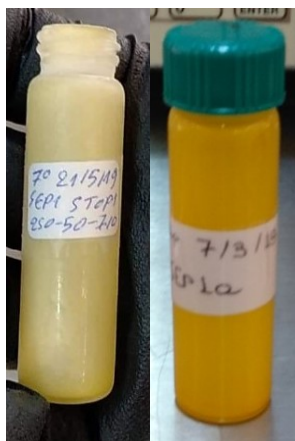
Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 8 πειράματα Υ.Ε. Τα 5 πρώτα έγιναν με καθαρό διαλύτη το διοξείδιο του άνθρακα. Μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές τιμές πίεσης εκχυλιστήρα (150, 200, 250 bar), δύο θερμοκρασίες εκχυλιστήρα (40, 50 °C) και δύο διαφορετικές κοκκομετρίες διαμέτρου φύλλων (257, 493 μm). Στο 6^ο και το 7^ο προστέθηκε συν-διαλύτης αιθανόλη σε ποσοστό 5% και 10% αντίστοιχα, ενώ στο 8^ο υπήρξε μίγμα συν-διαλύτη 10% με την αιθανόλη σε ποσοστό 50% w/w και το ιοντικό υγρό 2-HEAF κατά 50% w/w. Επιγραμματικά παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 5: Λειτουργικές Παράμετροι Πειραμάτων

exp	1	2	3	4	5	6	7	8
Πίεση Εκχυλιστήρα (bar)	150	200	250	250	250	250	250	250
Θερμοκρασία Εκχυλιστήρα (°C)	50	50	50	40	50	50	50	50
Μέση Διάμετρος Σωματιδίων (μm)	257	257	257	257	493	257	257	257
Συν-διαλύτης (% w/w)	0	0	0	0	0	5%EtOH	10%EtOH	5%EtOH 5%2HEAF

3.2.2. Συλλογή Εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα των φύλλων της ελιάς συλλέγονται στους δύο διαχωριστήρες ανά τακτά χρονικά διαστήματα από τις αντίστοιχες βάνες, καθ' όλη τη διάρκεια της διεργασίας. Συλλέγονται σε διαφορετικά, προ-ζυγισμένα δοχεία συλλογής. Στο τέλος του κάθε πειράματος τα γυάλινα φιαλίδια ζυγίζονται ξανά, ώστε να είναι γνωστό το βάρος του εκχυλίσματος που παραλείφθηκε.



Εικόνα 15: Δοχεία Συλλογής εκχυλίσματος με καθαρό CO₂



Εικόνα 16: Δοχεία Συλλογής Εκχυλίσματος με συν-διαλύτη



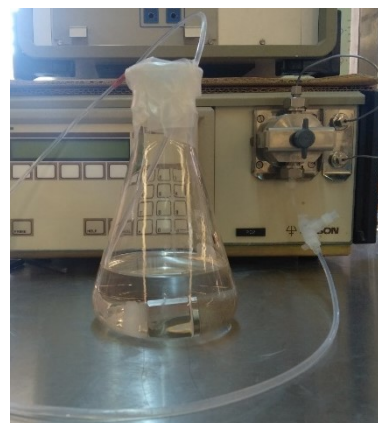
Εικόνα 17: Δοχεία συλλογής υπολειμμάτων από καθαρισμούς

3.2.3. Συν-διαλύτες

Ο συν-διαλύτης εισάγεται στη συσκευή ταυτόχρονα με τη ροή του CO₂ με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα μείγμα διαλυτών. Ο συν-διαλύτης είναι συνήθως διαλυμένος στο υπερκρίσιμο CO₂.

Η απαραίτητη ποσότητα συν-διαλύτη τοποθετείται για 20 min στους υπερήχους στη ρύθμιση Degas σε κωνική φιάλη, για να απομακρυνθεί ο αέρας. Στη συνέχεια, η αντλία του συν-διαλύτη (Εικόνα 18) συνδέεται με την αιθανόλη στην προκειμένη περίπτωση μέσω ενός μικρού σωλήνα. Με τη χρήση μιας σύριγγας εξέρχονται οι φυσαλίδες από τη ροή ώστε να αποφευχθεί η σπηλαιώση στην αντλία συν-διαλύτη.

Μόλις παρατηρηθεί ότι πλέον δεν υπάρχουν φυσαλίδες ο συν-διαλύτης είναι έτοιμος να «τρέξει». Από το ροόμετρο του συν-διαλύτη ρυθμίζεται η ροή του σύμφωνα με το επιθυμητό ποσοστό στη ροή διοξειδίου του άνθρακα. Κατά την έναρξη λειτουργίας της συσκευής, ο συν-διαλύτης πρέπει να εισαχθεί όταν η πίεση λειτουργίας φτάσει την επιθυμητή τιμή. Όταν συμπληρωθούν τα 255min η ροή του συν-διαλύτη διακόπτεται αλλά το CO₂ συνεχίζει να περνάει από τα φύλλα έως ότου αποβληθεί όλος ο συν-διαλύτης από τον εκχυλιστήρα (στέγνωμα).



Εικόνα 18: Διάταξη συν-διαλύτη στην Υ.Ε.

Αιθανόλη

Η αιθανόλη που χρησιμοποιείται ως συν-διαλύτης είναι καθαρότητας >99% από τη Merck KGaA με αριθμό CAS: 67-17-5.

Η ροή της αιθανόλης για το 5% της ροής CO₂ (6^ο πείραμα) ρυθμίζεται 2.112 mL/min, ενώ για το 10% του CO₂ (7^ο πείραμα) 4.225 mL/min.

Ιοντικό Υγρό

Το ιοντικό υγρό που χρησιμοποιήθηκε ως μέρος του συν-διαλύτη στην Υ.Ε. ονομάζεται 2-HEAF.

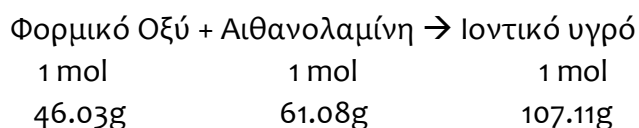
Σύνθεση 2-HEAF

Αντιδραστήρια:

- **Αιθανολαμίνη**, καθαρότητας >99% από τη Fisher Scientific, αριθμού CAS 141-43-5
- **Φορμικό Οξύ**, καθαρότητας >99% από τη Chem-Lab NV, αριθμού CAS 64-18-6

Η σύνθεση πραγματοποιείται σε τέσσερα στάδια διότι απαιτείται μεγάλη ποσότητα ιοντικού υγρού.

Συγκεκριμένα, συντίθενται 425 g ιοντικού υγρού 2 – HEAF.



Στη συνέχεια παρατίθεται η μεθοδολογία σύνθεσης του ιοντικού υγρού 2-HEAF.

Αρχικά, ένα μπαλόνι φουσκώνεται με άζωτο μέσω μιας φιάλης N₂ καθαρότητας 99.5% κβ (Εικόνα 19) για την εξασφάλιση αδρανούς ατμόσφαιρας κατά την αντίδραση. Το οξύ στη διάταξη της σύνθεσης του ιοντικού υγρού θα πρέπει να πέφτει στάγδην μέσα στην αμίνη ώστε να πραγματοποιηθεί ομαλά η αντίδραση και να μη σχηματιστούν παραπροϊόντα. Συναρμολογείται, λοιπόν η διάταξη της Εικόνας 20, όπου η αμίνη περιέχεται στην κάτω φιάλη και βρίσκεται μέσα σε κρύο λουτρό. Η θερμοκρασία πρέπει να παραμείνει σταθερή και καθώς η αντίδραση είναι εξώθερμη, η ψύξη είναι απαραίτητη. Αφού τελειώσει η προσθήκη του οξέος, αποσύρεται το λουτρό και το προϊόν που έχει δημιουργηθεί αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες. Ύστερα, απαιτείται ξήρανση για περίπου 10 ώρες και στη συνέχεια το ιοντικό υγρό σφραγίζεται σε

σκουρόχρωμο δοχείο διότι είναι φωτοευαίσθητο. Η αποθήκευση του γίνεται σε ξηραντήρα.



Εικόνα 19: Φούσκωμα μπαλιονιού από τη φιάλη αζώτου



Εικόνα 20: Διάταξη σύνθεσης ιοντικού υγρού

Το ιοντικό υγρό και η αιθανόλη 1:1 αναμιγνύονται σε κωνική φιάλη και στη συνέχεια εισέρχονται ως μίγμα στην Υ.Ε. με τον ίδιο τρόπο όπως στην περίπτωση της αιθανόλης, αλλά με τη διαφορά ότι το ιοντικό υγρό δεν υποβάλλεται στη συσκευή των υπερήχων.

3.3. Ανάλυση Εκχυλισμάτων

3.3.1. Προετοιμασία Εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα που συλλέγονται χρειάζεται να επεξεργαστούν κατάλληλα προκειμένου να αναλυθούν ως προς το περιεχόμενό τους.

Ξηρό Εκχύλισμα

Τα δείγματα που προέρχονται από Υ.Ε. με καθαρό CO₂ είναι ξηρά όπως φαίνεται στην Εικόνα 15. Για να σχηματιστεί διάλυμα, προστίθεται σε αυτά μικρή ποσότητα μεθανόλης (~500 μ L) και τα φιαλίδια τοποθετούνται σε Vortex για να επιτευχθεί καλύτερη διάλυση. Γνωρίζοντας το βάρος του καθαρού εκχυλίσματος υπολογίζεται η συγκέντρωσή του στο διάλυμα. Στη συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρείται στη συσκευή της Εικόνας 21 και πραγματοποιούνται οι κατάλληλες αραιώσεις (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) με μεθανόλη.



Εικόνα 21: Συσκευή Φυγοκέντρωσης mini Spin eppendorf

Υγρό Εκχύλισμα

Τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τις εκχυλίσεις με συν-διαλύτη είναι υγρά όπως φαίνεται στην Εικόνα 16. Για να συγκριθούν με τα ξηρά εκχυλίσματα είναι αναγκαία η απομάκρυνση του διαλύτη. Τα δείγματα υπόκεινται σε εξάτμιση υπό κενό στη συσκευή της Εικόνας 22, G3 της εταιρείας Heidolph (Germany). Η συσκευή τίθεται σε λειτουργία σε χαμηλή θερμοκρασία 40 °C ώστε να μην απομακρυνθούν και τα συστατικά του εκχυλίσματος. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η εξάτμιση της αιθανόλης, επομένως τα εκχυλίσματα με συν-διαλύτη αιθανόλη είναι πλέον ξηρά και ακολουθείται η προαναφερθείσα διαδικασία.

Ωστόσο, σχετικά με τα δείγματα που περιέχουν 2 – HEAF, η απομάκρυνση του συν-διαλύτη δεν είναι εφικτή, καθώς το ιοντικό υγρό δεν είναι καθόλου πτητικό. Στα δείγματα αυτά χρησιμοποιείται η εξάτμιση υπό κενό για την απομάκρυνση της αιθανόλης και έπειτα αναλύονται ως διάλυμα εκχυλίσματος. Αυτό σημαίνει ότι το μίγμα εκχυλίσματος φύλλων ελιάς και ιοντικού υγρού αντιμετωπίζεται ως το νέο προς ανάλυση δείγμα. Αραιώνεται κατά τον ίδιο τρόπο με τη μεθανόλη αλλά τα αποτελέσματα της ανάλυσης δεν είναι συγκρίσιμα με εκείνα των ξηρών εκχυλισμάτων. Για το λόγο αυτό, μέρος των δειγμάτων με συν-διαλύτη αιθανόλη αναλύεται ξανά, αυτή τη φορά ως διάλυμα, δηλαδή χωρίς να εξατμιστεί η αιθανόλη από το δείγμα. Με αυτό τον τρόπο είναι εφικτή η σύγκριση των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την Υ.Ε. με συν-διαλύτη.



Εικόνα 22: Συσκευή Εξάτμισης υπό κενό G3 Heidolph

Για κάθε πείραμα υπερκρίσιμης εκχύλισης υπήρξαν δύο δείγματα εκχυλισμάτων: Ένα από τον 1^ο διαχωριστήρα και ένα από τον 2^ο διαχωριστήρα. Άρα για κάθε Υ.Ε. πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε δύο δείγματα τα οποία επεξεργάστηκαν και αραιώθηκαν όπως έχει αναφερθεί.

3.3.2. Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης

Μέθοδος Ελεύθερης Ρίζας DPPH

Αντιδραστήρια:

- Ρίζα 2,2- διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζυλίου (DPPH) [Αριθμός CAS: 1898-66-4, Sigma-Aldrich, 99.5%]
- Μεθανόλη (methanol) [Αριθμός CAS: 67-56-1, Fisher Scientific, >99.8%]
- Εκχυλίσματα φύλλων ελιάς από Υπερκρίσιμη Εκχύλιση

Συσκευή:

- UV-Vis φασματοφωτόμετρο (Bel Photonics UV-M51)

Μεθοδολογία:

Διάλυμα DPPH:

Για την παρασκευή του διαλύματος DPPH, σε 100mL μεθανόλης προστίθενται 0.003g δραστικής ρίζας DPPH και το διάλυμα αναδεύεται για 15min.

Φωτομέτρηση:

Σε μία κυψελίδα εισάγονται 3.9 mL του διαλύματος μεθανόλης – ρίζας DPPH (οξειδωτικό). Για να μετρηθεί η απορρόφηση στα 515 nm χρησιμοποιείται το UV-Vis φασματοφωτόμετρο, αφού πρώτα μηδενιστεί με δείγμα καθαρής μεθανόλης. Ύστερα από τη μέτρηση του διαλύματος DPPH χωρίς το δείγμα (A_{control}) προστίθενται στην κυψελίδα 0.1 mL του εξεταζόμενου εκχυλίσματος (αντιοξειδωτικό) και λαμβάνονται μετρήσεις για $t=0$ και $t=20\text{min}$ (A_{sample}). Επειδή τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν έντονο πράσινο χρώμα, μετράται και η απορρόφησή τους σε καθαρή μεθανόλη, ώστε αν κριθεί σημαντική να αφαιρεθεί από το τελικό αποτέλεσμα. Στην περίπτωση πολύ χρωματισμένων διαλυμάτων χρειάζονται και παραπάνω αραιώσεις ($1/32$, $1/64$).



Εικόνα 23: Παραδείγματα μιγμάτων DPPH και αντιοξειδωτικών σε διάφορες αραιώσεις μετά την εξουδετέρωση

Στη συνέχεια κατασκευάζεται η καμπύλη του ποσοστού της ρίζας που εξουδετερώθηκε (% scavenging) ως προς τη συγκέντρωση του δείγματος (C δείγματος) και υπολογίζεται ο δείκτης IC_{50} .

3.3.3. Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου

Μέθοδος Folin – Ciocalteu

Αντιδραστήρια:

- Γαλλικό Οξύ (Gallic acid)
- Ανθρακικό Νάτριο (Na_2CO_3)
- Αιθανόλη (EtOH)
- Απιονισμένο Νερό (H_2O)
- Διάλυμα Folin-Ciocalteu

Συσκευή:

- UV-Vis φασματοφωτόμετρο (Bel Photonics UV-M51)

Διάλυμα Ανθρακικού Νατρίου (Na_2CO_3):

Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται 200 g άνυδρου Na_2CO_3 σε 800 mL απιονισμένο νερό. Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού υπό ανάδευση και εν συνεχεία αφήνεται να ψυχθεί. Τοποθετείται στο ψυγείο για 24 h και ακολουθεί διήθηση υπό κενό (Εικόνα 24). Αποθηκεύεται στο ψυγείο έως τη χρήση του. Διατηρείται για περίπου 1 – 2 εβδομάδες.



Εικόνα 24: Διήθηση υπό κενό ανθρακικού νατρίου

Παρασκευή διαλύματος Gallic acid (stock solution):

Σε ογκομετρική φιάλη 100 mL προστίθενται 0.500 g Gallic acid, 10 mL EtOH και απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα διατηρείται μέχρι δύο εβδομάδες στο ψυγείο.

Καμπύλη αναφοράς Gallic acid:

Σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL προστίθενται 0, 1, 2, 3, 5 και 10 mL από το stock διάλυμα Gallic acid και ακολουθεί συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. Οι περιεκτικότητες των διαλυμάτων που προκύπτουν είναι 0, 50, 100, 150, 250, 500 mg/L αντίστοιχα.



Μίγμα ολικού φαινολικού φορτίου δείγματος:

Προστίθενται σε δοκιμαστικό σωλήνα 100 μ L δείγμα κατάλληλα αραιωμένο με μεθανόλη (ή πρότυπο), 7.9 ml απιονισμένο νερό, 500 μ L αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu ακολουθεί ανάδευση σε Vortex. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία 30 s και εν συνεχεία προστίθενται 1500 μ L από το διάλυμα Na_2CO_3 . Ακολουθεί ανάδευση και πάλι σε Vortex. Ύστερα, το δείγμα φυγοκεντρείται για την καταβύθιση των αιωρούμενων στερεών και αφήνεται σε ηρεμία για 30 min σε υδατόλουτρο στους 40°C. Η τελική μορφή του δείγματος φαίνεται στην Εικόνα 25.

Εικόνα 25: Μίγμα μετά τη φυγοκέντρωση

Φωτομέτρηση:

Το φωτόμετρο ρυθμίζεται στα 765 nm και μηδενίζεται με τυφλό (στη θέση των 100 μ L δείγματος, προστίθενται 100 μ L απιονισμένου νερού). Ύστερα γίνεται η μέτρηση των δειγμάτων.

4. Αποτελέσματα – Σχολιασμός

4.1. Υγρασία Πρώτης Ύλης

Τα αποτελέσματα της ξήρανσης των φύλλων ελιάς φαίνονται στον Πίνακα 6. Η υγρασία υπολογίζεται από την διαφορά αρχικής (m_o) και τελικής μάζας μετά την ξήρανση (m_τ) ως προς την αρχική. Δηλαδή,

$$\% Y = \frac{m_o - m_\tau}{m_o} 100 \quad (4.1)$$

Πίνακας 6: Αποτελέσματα Ξήρανσης και Μέτρηση Υγρασίας των φύλλων ελιάς

Δείγμα	m_o (g)	m_τ (g)	$m_o - m_\tau$ (g)	%(w/w) Y_i
1	1.34	1.22	0.12	8.96
2	1.22	1.13	0.09	7.38
3	1.25	1.15	0.10	8.00

Η μέση υγρασία των φύλλων είναι 8.11% w/w. Η τιμή αυτή συνάδει με βιβλιογραφικές αναφορές στις οποίες έχει βρεθεί 6% w/w για φύλλα ελιάς προερχόμενα από την Ισπανία [44] και 8% w/w για φύλλα Ιταλικής προέλευσης [11].

Η υγρασία της πρώτης ύλης εν μέρει επηρεάζει την Υ.Ε. ωστόσο δεν εξετάζεται ως παράμετρος στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία.

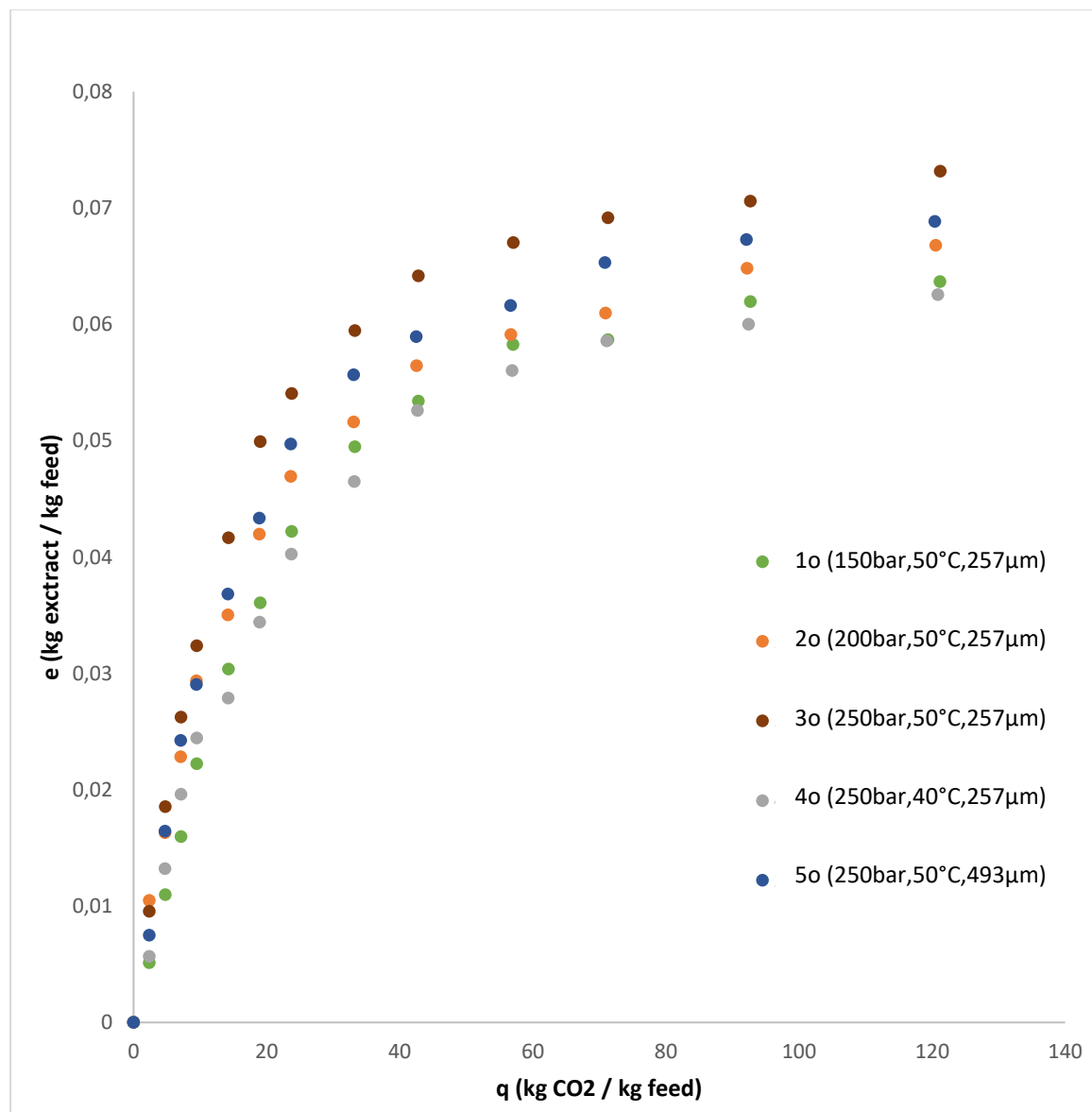
4.2. Πειράματα Υπερκρίσιμης Εκχύλισης

Η απόδοση του κάθε πειράματος υπολογίστηκε σύμφωνα με τη συνολική απώλεια βάρους του εκχυλιστήρα σε ποσοστό %. Στον Πίνακα 7 παρατίθενται τα αποτελέσματα.

Πίνακας 7: Απόδοση Πειραμάτων Υ.Ε.

exp	Στοιχεία Πειράματος	Απόδοση % w/w (Yield)
1	150-50-257	6.4
2	200-50-257	6.7
3	250-50-257	7.3
4	250-40-257	6.3
5	250-50-493	6.9
6	250-50-257-5%EtOH	8.8
7	250-50-257-10%EtOH	12.0
8	250-50-257-5%EtOH+5%2HEAF	14.1

Η εξέλιξη της απόδοσης % των πειραμάτων 1 έως 5 σε σχέση με την ποσότητα του διαλύτη ανοιγμένη ως προς την τροφοδοσία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 4:

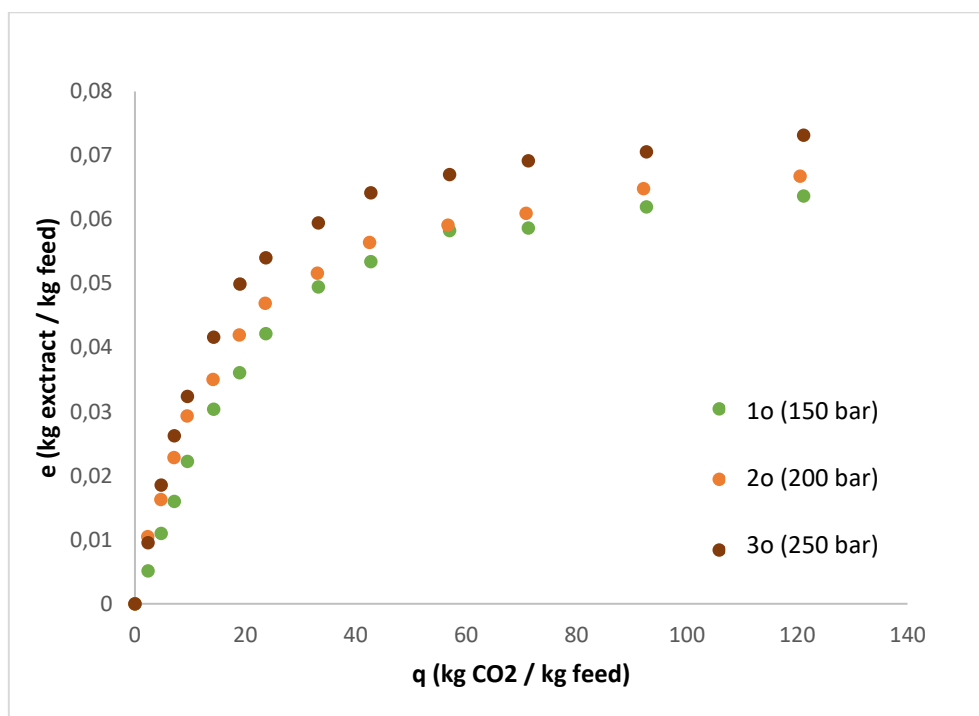


Διάγραμμα 4: Εξέλιξη της απόδοσης % ως προς την ποσότητα του διαλύτη ανοιγμένη προς την τροφοδοσία για τα πειράματα 1 - 5

Προκειμένου να σχολιασθούν τα αποτελέσματα θα εξεταστεί η κάθε παράμετρος ξεχωριστά.

Επίδραση της Πίεσης Λειτουργίας

Σε ό,τι αφορά στην πίεση λειτουργίας συγκρίνονται τα διαγράμματα των πειραμάτων 1, 2 και 3 (Διάγραμμα 5). Για σταθερή θερμοκρασία λειτουργίας στους 50 °C, η πίεση λειτουργίας λαμβάνει τις τιμές 150, 200 και 250 bar.



Διάγραμμα 5: Επίδραση της πίεσης στην απόδοση της Υ.Ε. για τα πειράματα 1, 2, 3 (50°C, 2kg/h, 257μm)

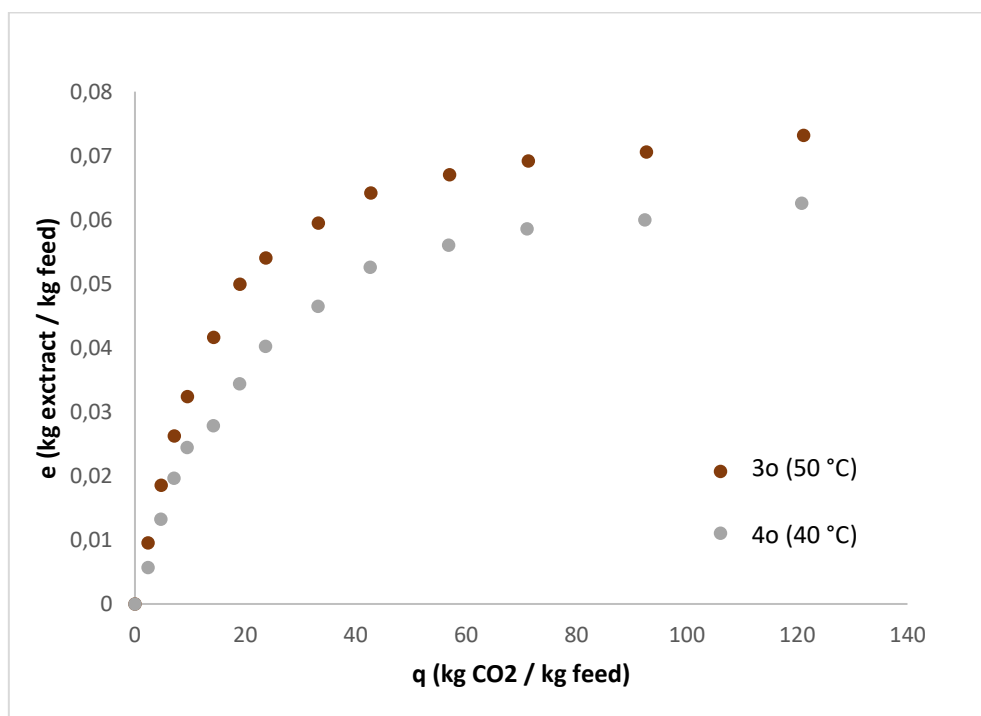
Παρατηρείται ότι με την αύξηση της πίεσης του εκχυλιστήρα αυξάνεται και η απόδοση της διεργασίας. Στα 150 bar η απόδοση είναι 6.4%, στα 200 bar 6.5% ενώ στα 250 bar 7.3% w/w. Το γεγονός αυτό ερμηνεύεται καθώς για σταθερή θερμοκρασία η αύξηση της πίεσης αυξάνει την πυκνότητα του διοξειδίου του άνθρακα (Πίνακας 8), επομένως και τη διαλυτική του ικανότητα. Κατά αυτό τον τρόπο περισσότερα συστατικά των φύλλων διαλύονται στο διαλύτη και συλλέγονται στο εκχύλισμα με την αύξηση της πίεσης.

Πίνακας 8: Πυκνότητα διοξειδίου του άνθρακα στους 50°C για διάφορες τιμές πίεσης [45]

Πίεση (bar)	Πυκνότητα (kg/m ³)
150	700
200	784
250	834

Επίδραση της Θερμοκρασίας Λειτουργίας

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην υπερκρίσιμη εκχύλιση φύλλων ελιάς παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 6. Σε σταθερή πίεση λειτουργίας 250 bar πραγματοποιήθηκαν 2 πειράματα, ένα στους 50°C και ένα στους 40°C. Από την εξέλιξη της απόδοσης αλλά και την τελική τιμή της (για το 3^ο: 7.3% και για το 4^ο: 6.3% w/w) συμπεραίνεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης. Η επίδραση της θερμοκρασίας εξαρτάται από δύο αντικρουόμενους παράγοντες: την πυκνότητα του CO₂ και την τάση ατμών των συστατικών των φύλλων της ελιάς [39]. Με την αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται μικρή μείωση της πυκνότητας (Πίνακας 9), επομένως φαίνεται ότι σε αυτές τις συνθήκες λειτουργίας (250 bar) η τάση ατμών των ουσιών που εκχυλίζονται κυριαρχεί σαν παράγοντας και οδηγεί σε αύξηση της διαλυτότητας.



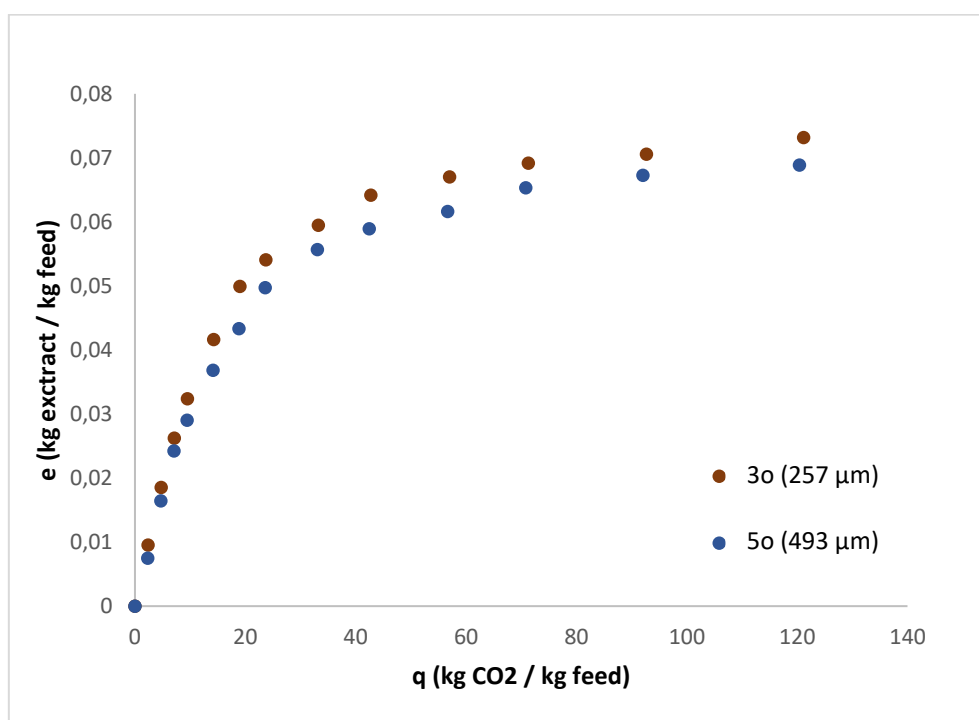
Διάγραμμα 6: Επίδραση της θερμοκρασίας στην απόδοση της Υ.Ε. για τα πειράματα 3, 4 (250 bar, 2 kg/h, 257 μm)

Πίνακας 9: Πυκνότητα διοξειδίου του άνθρακα στα 250 bar για διάφορες τιμές θερμοκρασίας [45]

Θερμοκρασία (°C)	Πυκνότητα (kg/m ³)
50	834
40	879

Επίδραση της Κοκκομετρίας των φύλλων ελιάς

Τα δεδομένα για την επίδραση της κοκκομετρίας παρατίθενται στο επόμενο διάγραμμα. Συγκρίνονται τα πειράματα 3 και 5 με μικρότερη και μεγαλύτερη διάμετρο κόκκων, αντίστοιχα. Η απόδοση του 3^{ου} πειράματος είναι 7.3% w/w και του 5^{ου}, 6.9% w/w. Προκύπτει ότι όταν τα φύλλα είναι αλεσμένα σε μικρότερη διάμετρο η διεργασία αποδίδει καλύτερα ωστόσο για τις κοκκομετρίες που εξετάσθηκαν η επίδραση είναι μικρή. Εν γένει, το μέγεθος των σωματιδίων είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει την Υ.Ε. των φύλλων ελιάς καθώς σχετίζεται με την επιφάνεια που εκτίθεται στον διαλύτη αλλά και την απελευθέρωση ελαίου από την πρώτη ύλη. Η ειδική επιφάνεια της στερεής τροφοδοσίας αυξάνεται όταν η ίδια ποσότητα φύλλων αποτελείται από σωματίδια μικρότερης διαμέτρου. Ταυτόχρονα απελευθερώνεται και περισσότερο έλαιο.



Διάγραμμα 7: Επίδραση της κοκκομετρίας στην απόδοση της Υ.Ε. για τα πειράματα 3, 5 (250bar, 2kg/h, 50°C)

Επίδραση της προσθήκης συν-διαλύτη

Η επίδραση της προσθήκης συν-διαλύτη δεν μπορεί να απεικονιστεί σε διάγραμμα εφόσον λαμβάνεται πειραματικά μόνο το τελευταίο σημείο της καμπύλης, εκείνο δηλαδή της συνολικής απόδοσης. Συγκρίνοντας ωστόσο αυτές τις τιμές για τα πειράματα 3, 6, 7 συμπεραίνεται ότι η χρήση αιθανόλης σαν συν-διαλύτη αυξάνει την απόδοση της Υ.Ε. Για τις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας (50°C) και πίεσης (250bar) και την ίδια κοκκομετρία (257μm), με το καθαρό διοξείδιο του άνθρακα η απόδοση ήταν 7.3%. Με την προσθήκη 5% w/w αιθανόλης η απόδοση αυξήθηκε στα 8.8%, με 10% w/w αιθανόλη η αύξηση ήταν μεγαλύτερη 12.0%, ενώ με μίγμα αιθανόλης – ιοντικού υγρού 10% w/w η απόδοση βρέθηκε 14.1%. Φαίνεται πως η προσθήκη αιθανόλης στην ροή διαλύτη εκχυλίζει περισσότερα συστατικά και αυτό αποδίδεται στο ότι είναι πολικό μόριο, ενώ το CO₂ άπολο. Στην περίπτωση του μίγματος αιθανόλης και ιοντικού υγρού η απόδοση της Υ.Ε. αυξήθηκε ελαφρώς. Αυτό οφείλεται στα χαρακτηριστικά της αιθανόλης (πολικό μόριο) αλλά και στην διαλυτότητα των συστατικών των φύλλων στο ιοντικό υγρό.

Η παράμετρος που επηρεάζει περισσότερο την υπερκρίσιμη εκχύλιση στις συνθήκες που μελετήθηκαν φαίνεται να είναι η χρήση συν-διαλύτη. Ακολουθεί η θερμοκρασία εκχύλισης και η πίεση, ενώ η κοκκομετρία των αλεσμένων φύλλων αποτελεί τον ασθενέστερο παράγοντα στην απόδοση της διεργασίας.

4.3. Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης Εκχυλισμάτων

Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις για όλα τα πειράματα με εκχυλίσματα και από τους δύο διαχωριστήρες (SEP1, SEP2) με τη μέθοδο της ελεύθερης ρίζας DPPH. Τα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν σε μεθανόλη. Για τα πειράματα 6, 7, το εκχύλισμα που λαμβάνεται είναι υγρό καθώς περιλαμβάνει και το συν-διαλύτη. Οπότε τα δείγματα υποβλήθηκαν σε εξάτμιση υπό κενό και στη συνέχεια διαλύθηκαν εκ νέου σε μεθανόλη. Η τιμή που υπολογίστηκε με βάση το ξηρό εκχύλισμα είναι ο δείκτης IC₅₀ που εκφράζει τη συγκέντρωση του δείγματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση του 50% της ελεύθερης ρίζας DPPH. Όσο μικρότερος, τόσο ισχυρότερο είναι το αντιοξειδωτικό. Όταν το ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας είναι κάτω από 50% τότε θεωρείται πως το δείγμα δεν παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση.

Υπολογισμοί

Από τη φωτομέτρηση λαμβάνονται τρεις τιμές. Η απορρόφηση του διαλύματος ρίζας DPPH (Abs₀), η απορρόφηση του διαλύματος που περιλαμβάνει και το δείγμα μετά από 20 λεπτά εξουδετέρωσης (Abs₂₀) και εκείνη του δείγματος σε

διάλυμα μεθανόλης (Abs_{meth}). Με την αφαίρεση $Abs_{20} - Abs_{meth}$ λαμβάνεται η τελική απορρόφηση της ρίζας μετά την εξουδετέρωση της από το αντιοξειδωτικό (Abs_t).

Ύστερα, βρίσκεται το ποσοστό της ρίζας που εξουδετερώθηκε από τον τύπο:

$$\% Sca = \frac{Abs_0 - Abs_t}{Abs_0} \cdot 100 \quad (4.2)$$

Κατασκευάζεται το διάγραμμα ποσοστού εξουδετέρωσης ως προς τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού (% Sca – $C_{δείγματος}$), η οποία είναι γνωστή. Το σύνολο των αραιώσεων του δείγματος δίνει τα σημεία στο διάγραμμα από τα οποία διέρχεται η βέλτιστη καμπύλη.

Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο δείκτης IC_{50} από την εξίσωση της κάθε καμπύλης, ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα. Όπου $y = 50\%$ και $x = IC_{50}$.

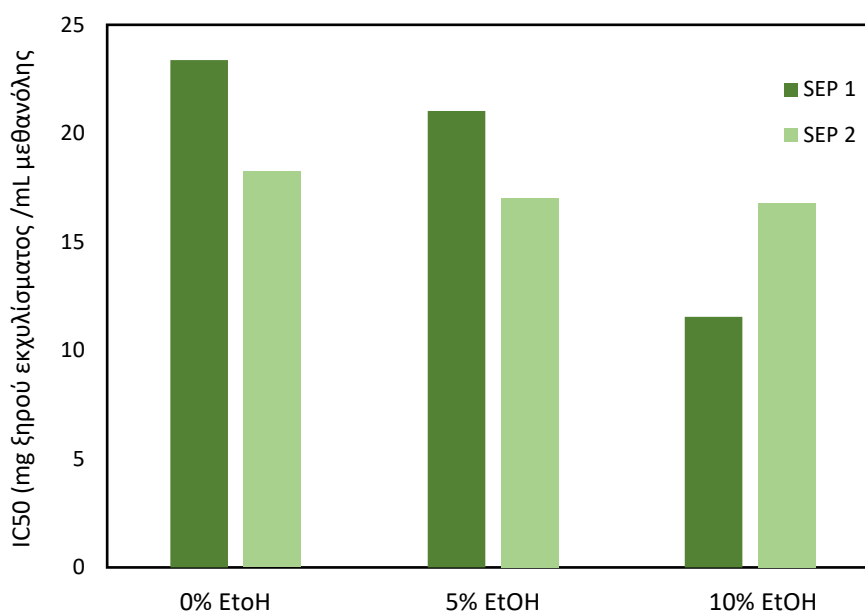
Πίνακας 10: Αποτελέσματα Αντιοξειδωτικής Δράσης Εκχυλίσμάτων (1)

exp	Στοιχεία Πειραμάτων	SEP 1	SEP 2
		IC_{50} (mg ex/mL sol)	IC_{50} (mg ex/mL sol)
1	150-50-257	-	-
2	200-50-257	18.09	-
3	250-50-257	23.37	18.24
4	250-40-257	-	-
5	250-50-493	-	-
6	250-50-257-5%etOH	21.03	17.01
7	250-50-257-10%etOH	11.55	16.81

Η Υ.Ε. με CO_2 δεν αποδίδει σε ιδιαίτερα δραστικά εκχυλίσματα. Συγκεκριμένα, κατά τις εκχυλίσεις στους $40^\circ C$ (4° πείραμα), στα 150 bar (1° πείραμα) και στην μεγαλύτερη κοκκομετρία (5° πείραμα) δεν υπάρχουν αντιοξειδωτικά στο προϊόν. Μη δραστικό εκχύλισμα παρουσιάζεται και στο πείραμα μέτριας πίεσης (2°) για τον 2° διαχωριστήρα. Όσο για τον πρώτο διαχωριστήρα τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν μέτρια αντιοξειδωτική δράση στα πειράματα 2 και 3 με την τιμή του IC_{50} να είναι ελάχιστα καλύτερη, σε αυτή την περίπτωση, στη χαμηλότερη πίεση. Σε υψηλότερη πίεση εκχυλίζονται παραπάνω συστατικά χωρίς αυτό να σημαίνει ότι είναι όλα αντιοξειδωτικά, με αποτέλεσμα να υπάρχει πιθανότητα μείωσης της δραστικότητας του προϊόντος. Ωστόσο για τη γενίκευση των συμπερασμάτων απαιτούνται περισσότερες πειραματικές μετρήσεις.

Συγκρίνοντας τα πειράματα με ποσοστό αιθανόλης στη ροή διαλύτη [3° : 0%, 6° : 5%, 7° : 10%] παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται το ποσοστό αιθανόλης τόσο βελτιώνεται και η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλίσμάτων του πρώτου

διαχωριστήρα, ενώ του δεύτερου παραμένει σχεδόν σταθερή, με πολύ μικρή βελτίωση. Το καλύτερο δείγμα είναι εκείνο από το πείραμα με 10% αιθανόλης και από τον πρώτο διαχωριστήρα ($IC_{50} = 11.55 \text{ mg ex/mL sol}$). Η τιμή 16.81 για τον 2^ο διαχωριστήρα του 7^{ου} πειράματος φαίνεται να μη συνάδει με τις υπόλοιπες και θεωρείται ότι βρίσκεται στα πλαίσια ανακρίβειας της μέτρησης και σφάλματος κατά τη δειγματοληψία.

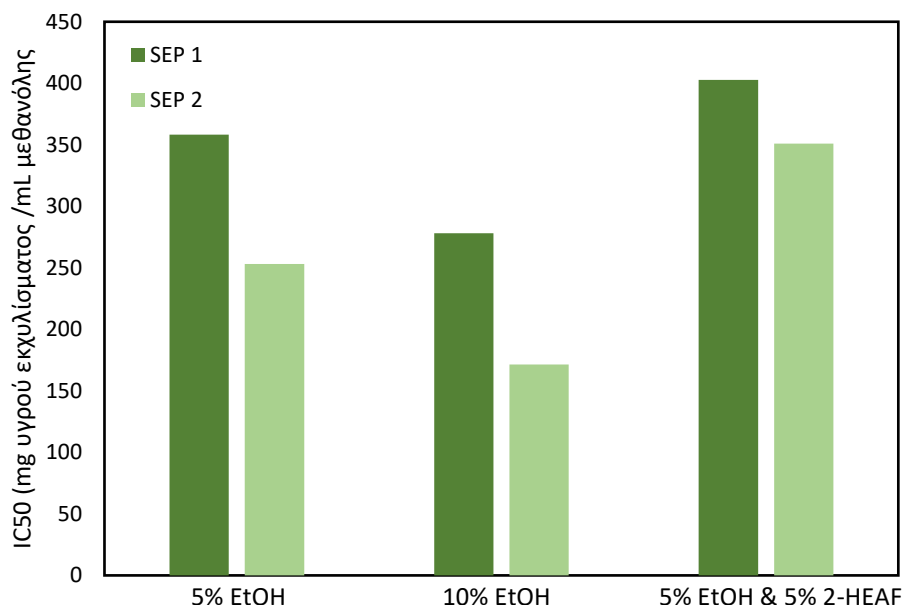


Διάγραμμα 8: Δείκτης IC_{50} για τα εκχυλίσματα των πειραμάτων 3, 6, 7

Το 8^ο πείραμα περιλαμβάνει στο συν-διαλύτη και ιοντικό υγρό 2-HEAF, το οποίο δε μπορεί να απομονωθεί από το εκχύλισμα. Για το λόγο αυτό υπολογίζεται η αντιοξειδωτική δράση του διαλύματος που περιλαμβάνει στερεό εκχύλισμα διαλυμένο στο ιοντικό υγρό. Επομένως, το δείγμα που λαμβάνεται από την Υ.Ε. υπόκειται σε απόσταξη υπό κενό ώστε να απομακρυνθεί η αιθανόλη και στη συνέχεια αναλύεται όπως τα προηγούμενα. Προκειμένου να συγκριθεί ο δείκτης IC_{50} με τα πειράματα 6 και 7 αναλύονται και αυτά ως διάλυμα αιθανόλης και όχι ως στερεό δείγμα. Έτσι, ο δείκτης IC_{50} υπολογίζεται σε mg υγρού εκχυλίσματος/mL διαλύτη μεθανόλης (mg s/mL sol).

Πίνακας 11: Αποτελέσματα Αντιοξειδωτικής Δράσης Εκχυλισμάτων (2)

No exp	Στοιχεία Πειραμάτων	SEP 1	SEP 2
		IC_{50} (mg s/mL sol)	IC_{50} (mg s/mL sol)
6	5%etOH	358.26	253.25
7	10%etOH	230.12	171.48
8	10%(1:1 etOH:2-HEAF)	402.71	350.94



Διάγραμμα 9: Δείκτης IC_{50} για τα πειράματα 6-8

Παρατηρείται ότι και πάλι η μεγαλύτερη προσθήκη αιθανόλης (10%) παρουσιάζει την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση, ενώ η προσθήκη ιοντικού υγρού μειώνει σε κάποιο βαθμό την ποιότητα του εκχυλίσματος. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη πολικότητα του ιοντικού υγρού λόγω της οποίας εκχυλίζονται πολύ περισσότερα συστατικά από τα φύλλα. Αυτά δεν είναι πάντα αντιοξειδωτικά οπότε η δράση του εκχυλίσματος μειώνεται.

4.4. Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου

Οι μετρήσεις ολικού φαινολικού περιεχομένου πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του αντιδραστηρίου Folin – Ciolcateau σε όλα τα πειράματα υπερκρίσιμης εκχύλισης. Τα αποτελέσματα βρίσκονται στον Πίνακα 12. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) εκφράζεται σε mg γαλλικού οξέος ανά g ξηρού εκχυλίσματος για τα πειράματα 1 – 7. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή τόσο περισσότερες φαινολικές ενώσεις περιέχονται στο δείγμα.

Υπολογισμοί

Η τιμή της απορρόφησης του δείγματος μεταφράζεται σε συγκέντρωση γαλλικού οξέος μέσω της καμπύλης αναφοράς:

$$y = 0.0012 \cdot x + 0.44 \quad (4.3)$$

Όπου,

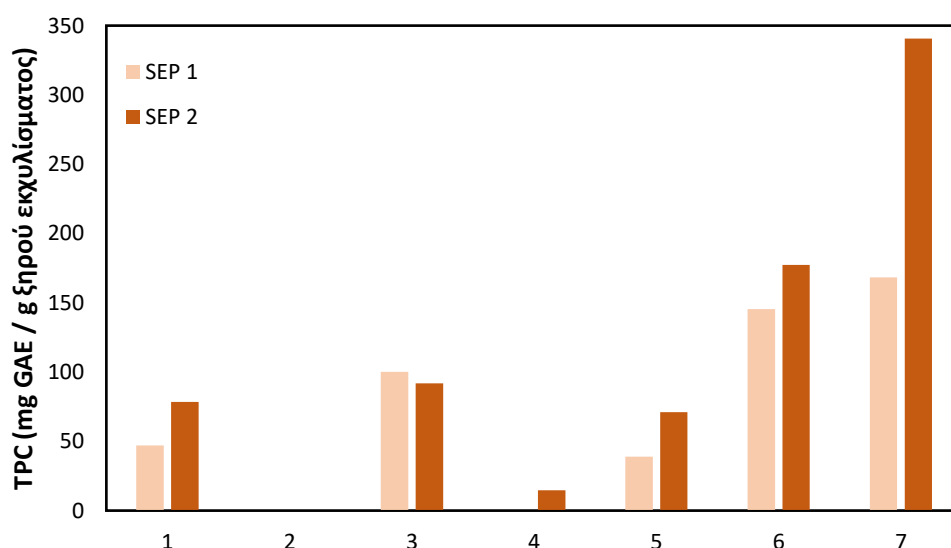
y: η απορρόφηση στα 765 nm, x: η συγκέντρωση γαλλικού οξέος (ppm)

Στη συνέχεια, πολλαπλασιάζοντας με το συντελεστή αραίωσης βρίσκεται η συγκέντρωση γαλλικού οξέος στο αρχικό δείγμα. Διαιρώντας με τη συγκέντρωση του δείγματος και με μία μετατροπή μονάδων λαμβάνεται η τιμή

του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε mg GAE / g ξηρού εκχυλίσματος. Για τα τρία τελευταία πειράματα οι αναλύσεις κατά αντιστοιχία με την αντιοξειδωτική δράση εκφράζονται και σε mg GAE / g υγρού εκχυλίσματος.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου για τα πειράματα 1 - 7

exp	Στοιχεία Πειραμάτων	TPC	
		SEP 1	SEP 2
1	150-50-257	47.12	78.49
2	200-50-257	-	-
3	250-50-257	100.25	91.95
4	250-40-257	-	14.73
5	250-50-493	38.98	71.03
6	250-50-257-5%etOH	145.38	177.23
7	250-50-257-10%etOH	168.29	340.71



Διάγραμμα 10: Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο εκχυλισμάτων για τα πειράματα 1-7

Η υψηλότερη τιμή TPC εμφανίζεται στα εκχυλίσματα με την αιθανόλη, ενώ κατά βάση ο δεύτερος διαχωριστήρας έχει καλύτερα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν σε γενικές γραμμές με τις αναλύσεις αντιοξειδωτικής δράσης. Ωστόσο, η αντιοξειδωτική δράση είναι καλύτερη στον 1^ο διαχωριστήρα στον οποίο συλλέγονται συστατικά μεγάλου μοριακού βάρους. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονισθεί ότι ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης είναι ανάλογος της αναλυτικής μεθόδου που χρησιμοποιείται. Συγκεκριμένα, η μέθοδος DPPH αξιολογεί την ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να ασκούν αντιοξειδωτική δράση [46]. Τα φύλλα της ελιάς περιέχουν διάφορες μονομερείς και πολυμερείς φαινολικές ενώσεις και ιδιαίτερα οι φαινόλες μεγάλου μοριακού βάρους είναι εκείνες που αποδίδουν σε καλύτερη αντιοξειδωτική δράση [47]. Επίσης, σημαντική είναι και η συνεργιστική δράση

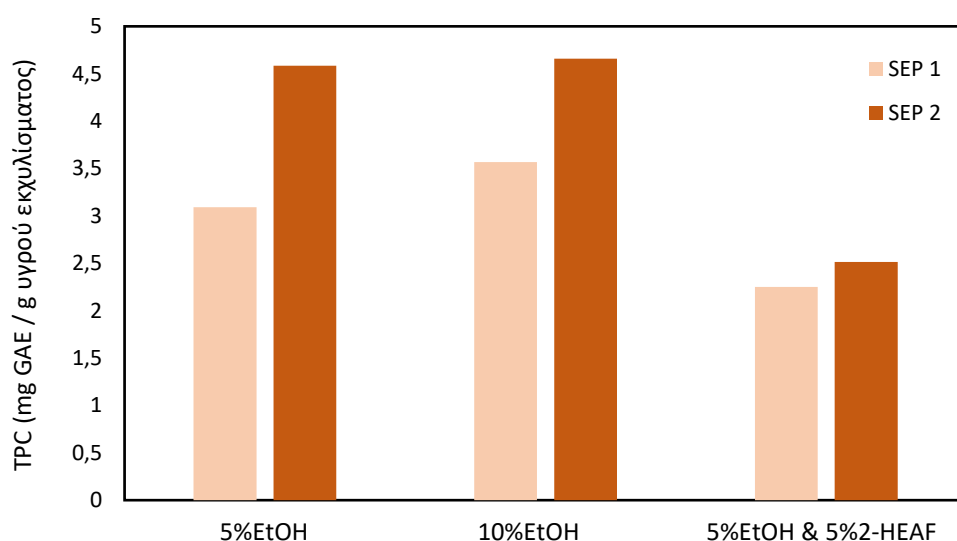
διαφόρων ενώσεων που μαζί με τις φαινόλες οδηγούν σε ακόμα καλύτερα αποτελέσματα.

Τα πειράματα με συν-διαλύτη αιθανόλη (6, 7) εκφράζονται επιπλέον και σε mg GAE / g υγρού εκχυλίσματος ώστε να μπορούν να συγκριθούν με τις αναλύσεις του πειράματος 8 με το ιοντικό υγρό.

Πίνακας 13: Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο εκχυλισμάτων με συν-διαλύτη (mg GAE/g υγρού εκχυλίσματος)

No exp	Στοιχεία Πειραμάτων	TPC	
		SEP 1	SEP 2
6	5%etOH	3.09	4.58
7	10%etOH	3.57	4.66
8	5%etOH, 5% 2-HEAF	2.25	2.51

Όπως είναι διακριτό και στο διάγραμμα, ο δεύτερος διαχωριστήρας σε κάθε περίπτωση παρουσιάζει περισσότερες φαινολικές ενώσεις από ότι ο πρώτος. Επίσης, τα εκχυλίσματα με το μεγαλύτερο ποσοστό αιθανόλης στη ροή του διαλύτη (10%) έχουν καλύτερα αποτελέσματα και ακολουθούν με μικρή διαφορά τα εκχυλίσματα του πειράματος 6 (5% αιθανόλη). Τα δείγματα από το πείραμα με την προσθήκη ιοντικού υγρού έδειξαν μικρότερη δράση ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο.



Διάγραμμα 11: Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο εκχυλισμάτων με συν-διαλύτη

4.5. Μοντελοποίηση Υπερκρίσιμης Εκχύλισης

Για τη μοντελοποίηση των πειραμάτων Υ.Ε. χρησιμοποιήθηκαν τρία μαθηματικά μοντέλα διαφορετικής πολυπλοκότητας. Τα πειραματικά σημεία συμβολίζονται με κουκίδες και οι καμπύλες εκχύλισης που προκύπτουν από τα μοντέλα παριστάνονται με γραμμές. Στα αποτελέσματα παρουσιάζεται και η μέση

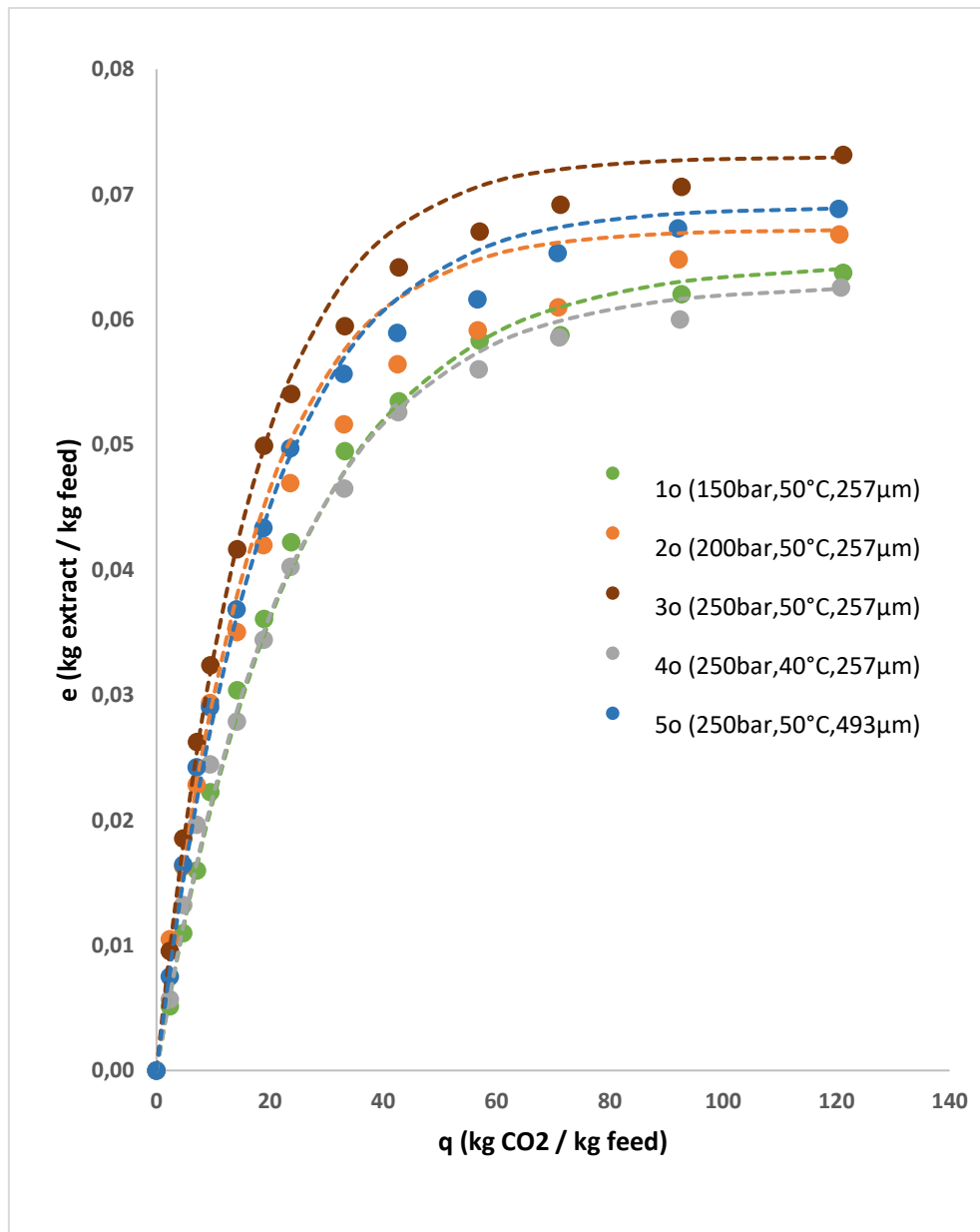
απόλυτη απόκλιση (Absolute Average Deviation, AAD) όπως και η μέση τιμή αυτής για τα πειράματα 1 έως 5 (\widetilde{AAD} %).

$$AAD\% = \frac{|e_{\text{exp}} - e_{\text{calc}}|}{e_{\text{exp}}} 100 \quad (4.4)$$

$$\widetilde{AAD}\% = \frac{\sum_{i=1}^5 AAD\%_i}{5} \quad (4.5)$$

4.5.1. Sulaiman et al (2012)

Τα αποτελέσματα του μοντέλου παρατίθενται στο παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 12: Προσαρμογή Μοντέλου Sulaiman στα Πειραματικά Δεδομένα

Το μοντέλο Sulaiman προσαρμόζεται μέτρια στα πειραματικά δεδομένα και παρουσιάζει μέσο σφάλμα 4.29%. Η προσαρμογή των δεδομένων υστερεί κυρίως στο ενδιάμεσο τμήμα της καμπύλης.

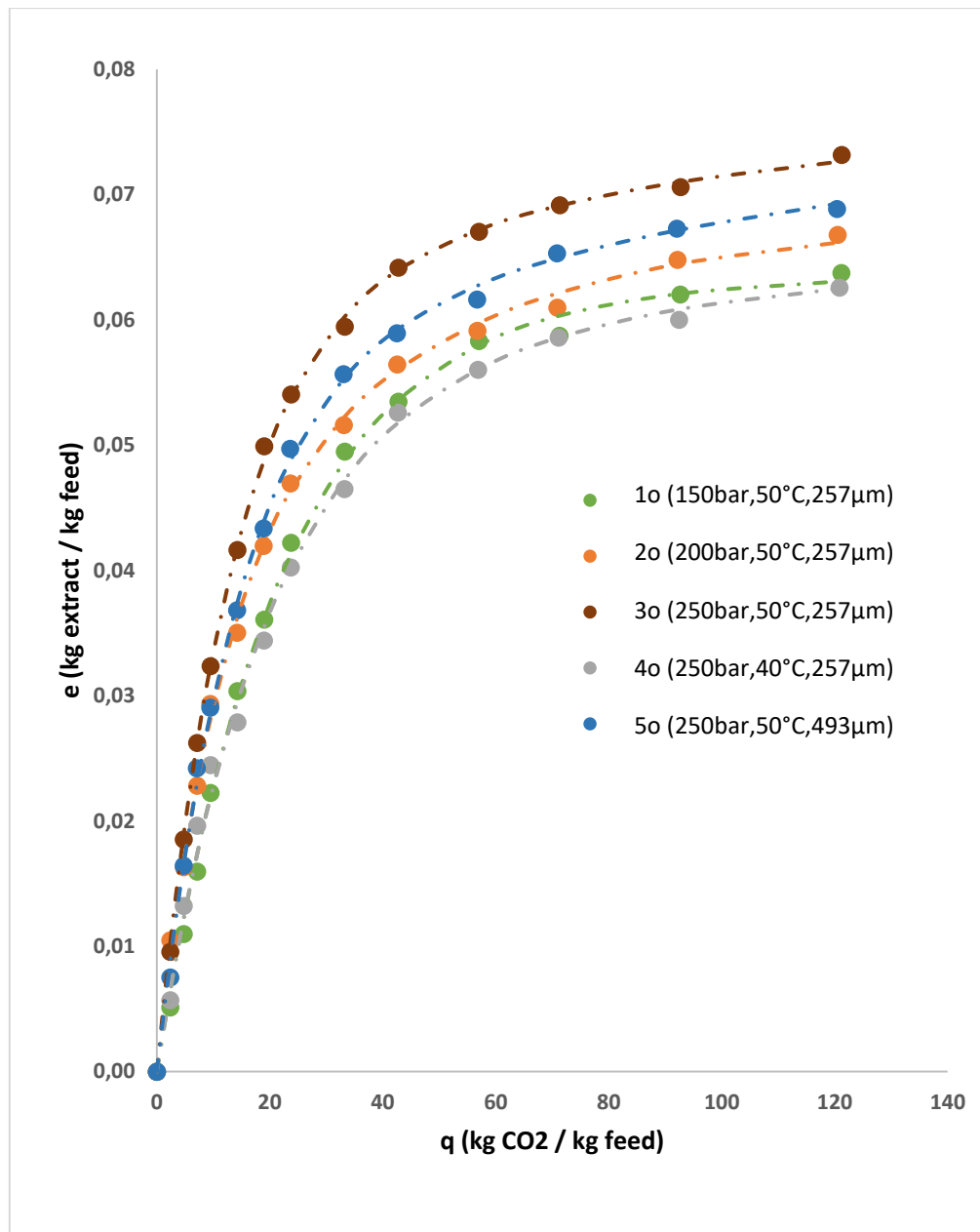
Η παράμετρος που υπολογίζεται μέσω του μοντέλου αυτού είναι ο ογκομετρικός συντελεστής μεταφοράς μάζας της υγρής φάσης ka (s^{-1}) και οι τιμές του φαίνονται στον Πίνακα 14. Ο συντελεστής ka λαμβάνει υψηλότερη τιμή με αύξηση της πίεσης και της θερμοκρασίας και αυτό είναι λογικό καθώς αυξάνεται και ο ρυθμός εκχύλισης.

Πίνακας 14: Παράμετροι και σφάλμα μοντέλου Sulaiman

No exp	Στοιχεία Πειράματος	e_i	ka ($\cdot 10^{-4}$)	AAD%
1	150-50-257	0.065	3.21	3.84
2	200-50-257	0.067	4.61	6.15
3	250-50-257	0.073	4.74	2.84
4	250-40-257	0.063	3.39	4.74
5	250-50-493	0.069	4.15	3.87
			$\overline{AAD}\%$	4.29

4.5.2. So & MacDonald (1986)

Οι υπολογισμοί του μοντέλου αυτού γίνονται με δύο διαφορετικούς τρόπους (So&MacDonald_1, So&MacDonald_2). Τα αποτελέσματα του μοντέλου So&MacDonald_1 παρουσιάζονται στο επόμενο διάγραμμα.



Διάγραμμα 13: Προσαρμογή μοντέλου So & MacDonald_1 στα πειράματα 1 - 5

Το μοντέλο των So & MacDonald_1 προσαρμόζεται αρκετά καλά στα πειραματικά δεδομένα της Υ.Ε. και η μέση απόκλιση μεταξύ των πειραματικών και των υπολογισμένων τιμών της απόδοσης είναι 2.77%.

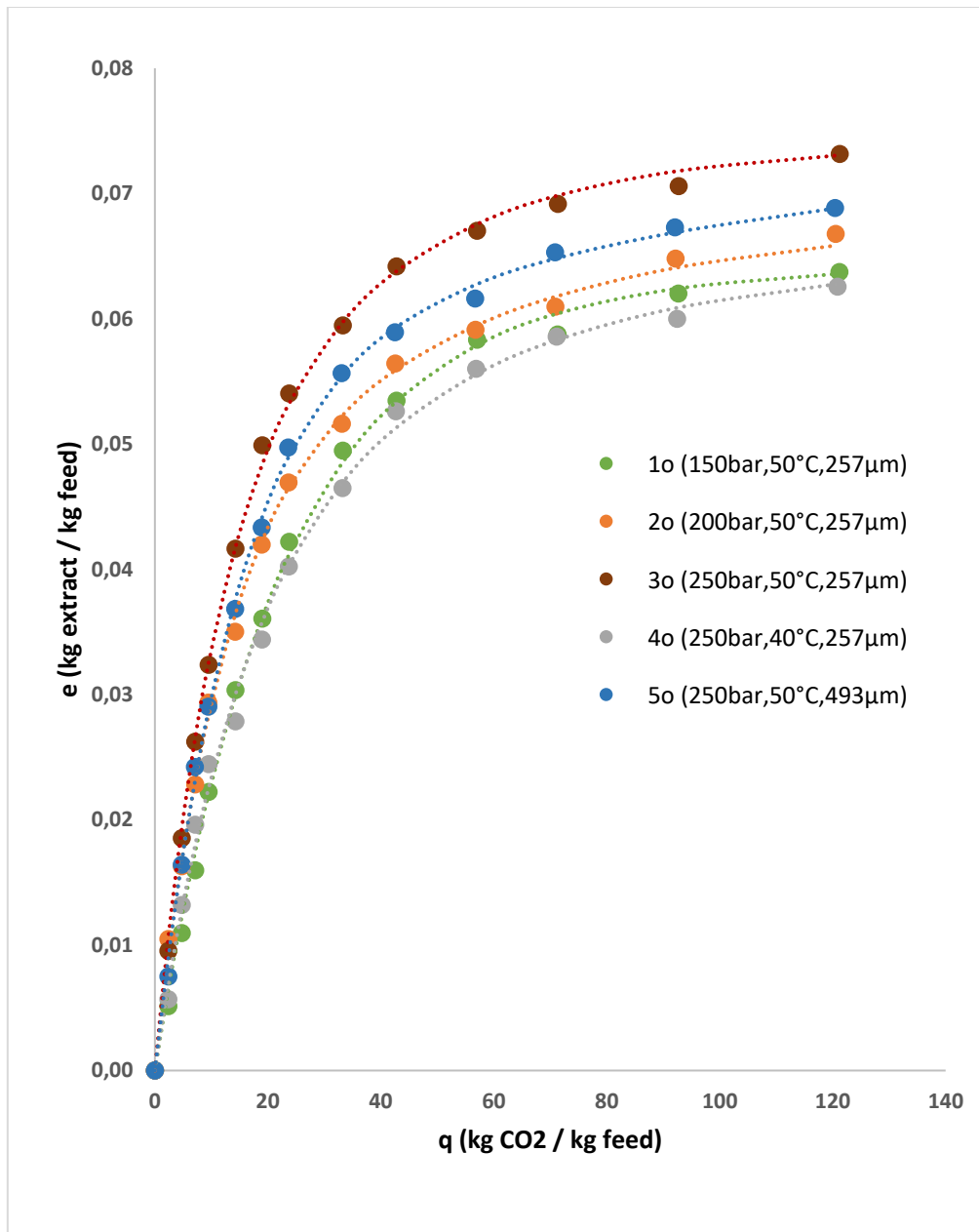
Επιπλέον, παρατίθενται οι παράμετροι που υπολογίστηκαν για κάθε πείραμα:

Πίνακας 15: Παράμετροι και σφάλμα μοντέλου So & MacDonald_1

exp	Στοιχεία Πειράματος	Y_e	Y_e^d	Y_e^w	k_w	k_d	AAD
1	150-50-257	0.065	0.004	0.061	0.022	0.003	3.99
2	200-50-257	0.068	0.031	0.037	0.044	0.011	2.17
3	250-50-257	0.076	0.018	0.058	0.036	0.007	1.18
4	250-40-257	0.065	0.017	0.048	0.026	0.008	4.09
5	250-50-493	0.076	0.021	0.055	0.033	0.005	2.44
$\overline{AAD}\%$							2.77

Φαίνεται ότι ο συντελεστής μεταφοράς μάζας του πρώτου σταδίου k_w (πλύση) είναι μεγαλύτερος από εκείνον του δεύτερου σταδίου k_d (διάχυση). Αυτό παρατηρείται και στη βιβλιογραφία [35]. Επίσης, κατά το στάδιο της πλύσης εκχυλίζεται το μεγαλύτερο μέρος των εκχυλίσμων ουσιών, δηλαδή η τιμή της Y_e^w είναι μεγαλύτερη της Y_e^d και αυτό φαίνεται να συμβαίνει σε όλες τις συνθήκες.

Ο δεύτερος τρόπος υπολογισμού της καμπύλης απόδοσης της Υ.Ε. μέσω του μοντέλου αυτού (So&MacDonald_2) είναι η θεώρηση της μεταβλητής Y_e^w ίση με την τιμή που λαμβάνουν τα πειραματικά σημεία στο τέλος της σχηματιζόμενης ευθείας, δηλαδή στο πέρας του πρώτου σταδίου της πλύσης. Έτσι, οι Y_e και Y_e^w είναι γνωστές, η Y_e^d υπολογίζεται από τη σχέση (A2) και οι συντελεστές μεταφοράς, ως προσαρμόσιμες παράμετροι επιλύονται μέσω solver προς ελαχιστοποίηση του σφάλματος όπως προηγουμένως. Σύμφωνα με τα παραπάνω λαμβάνονται τα επόμενα αποτελέσματα.



Διάγραμμα 14: Προσαρμογή μοντέλου So & MacDonald_2 στα πειράματα 1 - 5

Η απόκλιση του συγκεκριμένου τρόπου υπολογισμού του μοντέλου δε διαφέρει σε αξιοσημείωτο βαθμό από την προηγούμενη και έχει μέσο όρο 2.99%. Ωστόσο, η παραδοχή ότι η τιμή της τελικής απόδοσης του σταδίου της πλύσης είναι ίση με τη λήξη του ευθύγραμμου τμήματος που σχηματίζουν τα πειραματικά σημεία οδηγεί σε επισφαλή αποτελέσματα για τις υπόλοιπες παραμέτρους. Είναι γεγονός ότι τα δύο στάδια – πλύση και διάχυση - για κάποιο ενδιαμέσο χρονικό διάστημα συμβαίνουν συγχρόνως. Αυτό σημαίνει ότι η λήξη του πρώτου σταδίου δεν είναι πάντα διακριτή, γι' αυτό η τιμή του Y_e^w δεν είναι απόλυτα έγκυρη.

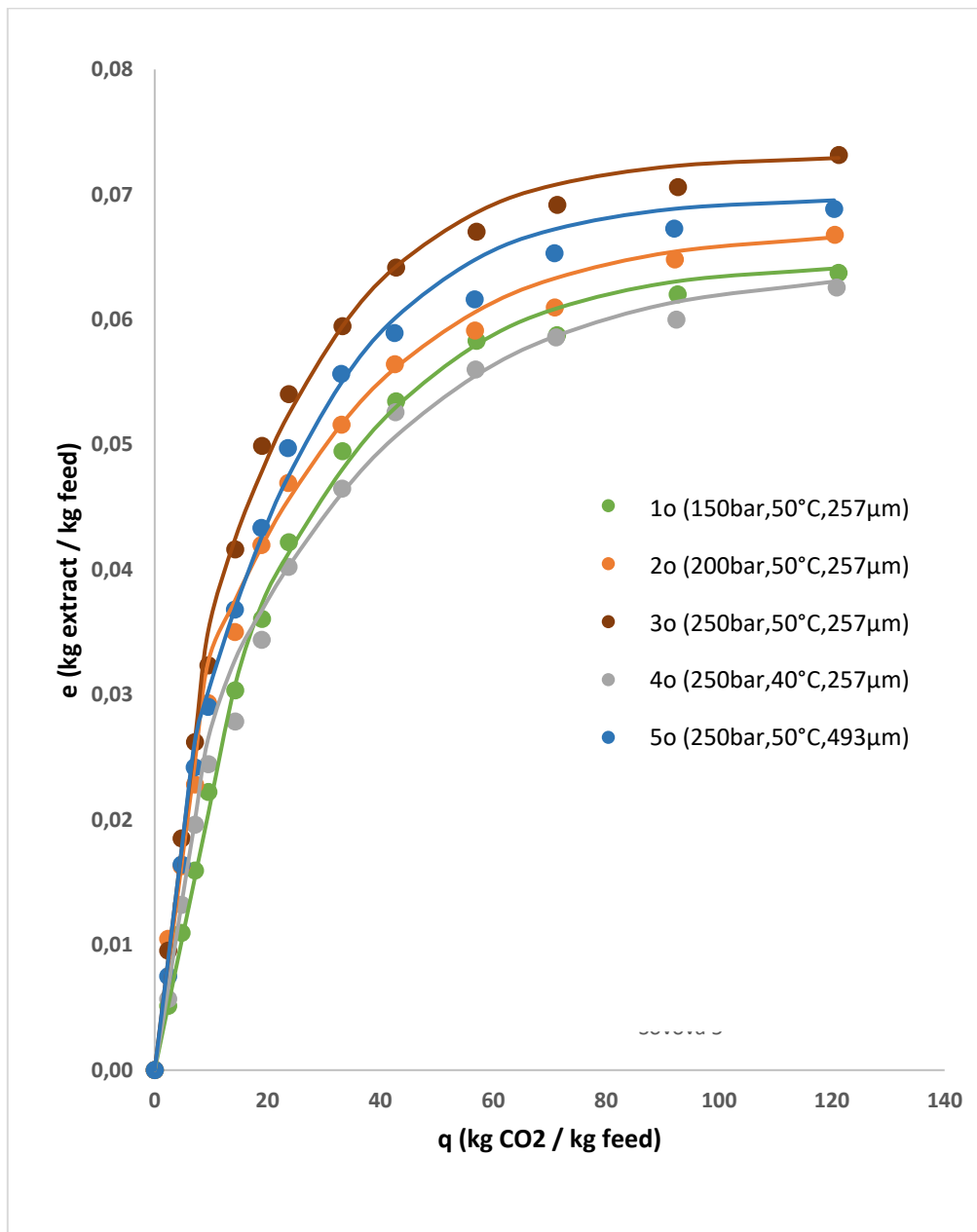
Πίνακας 16: Παράμετροι και σφάλμα μοντέλου *So & MacDonald*_2

exp	Στοιχεία Πειράματος	Y_e	Y_e^d	Y_e^w	k_w	k_d	AAD
1	150-50-257	0.065	0.020	0.045	0.025	0.013	4.20
2	200-50-257	0.068	0.028	0.040	0.043	0.010	2.26
3	250-50-257	0.074	0.034	0.040	0.046	0.014	1.86
4	250-40-257	0.065	0.030	0.035	0.033	0.010	4.15
5	250-50-493	0.074	0.019	0.055	0.033	0.005	2.51
$\overline{AAD}\%$							2.99

Από τον Πίνακα 16 φαίνεται ότι και σε αυτή την περίπτωση ο συντελεστής μεταφοράς μάζας για την πλύση k_w είναι μεγαλύτερος από το συντελεστή μάζας για τη διάχυση k_d , όπως επίσης τα Y_e^w είναι μεγαλύτερα των Y_e^d .

4.5.3. Sonova et al (1993)

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στο Διάγραμμα 15:



Διάγραμμα 15: Προσαρμογή μοντέλου Sonova στα πειράματα 1 - 5

Το μοντέλο προσαρμόζεται αρκετά καλά στα πειραματικά δεδομένα όπως φαίνεται και στην τυπική απόκλιση, η μέση τιμή της οποίας είναι 3.51%.

Παρακάτω παρατίθενται οι παράμετροι του μοντέλου Sonona για κάθε πείραμα με διαλύτη το καθαρό CO₂:

Πίνακας 17: Παράμετροι και σφάλμα μοντέλου Sonona

exp	Στοιχεία Πειράματος	y_r	x_o	x_k	$Z\dot{q} \cdot 10^4$	$W\dot{q} \cdot 10^3$	AAD%
1	150-50-257	0.00216	0.069	0.040	6.09	3.43	2.49
2	200-50-257	0.00345	0.072	0.042	5.13	3.04	4.22
3	250-50-257	0.00370	0.079	0.046	7.72	3.85	2.78
4	250-40-257	0.00280	0.069	0.040	3.20	2.66	4.09
5	250-50-493	0.00370	0.075	0.051	4.41	3.84	3.99
							$\overline{AAD}\%$
							3.51

Οι αδιάστατοι συντελεστές μεταφοράς μάζας για τη φάση του ρευστού και του στερεού, Z και W πολλαπλασιάζονται με το \dot{q} ώστε να μην εμπεριέχεται η ροή του διαλύτη στις παραμέτρους. Έχουν μονάδα s⁻¹.

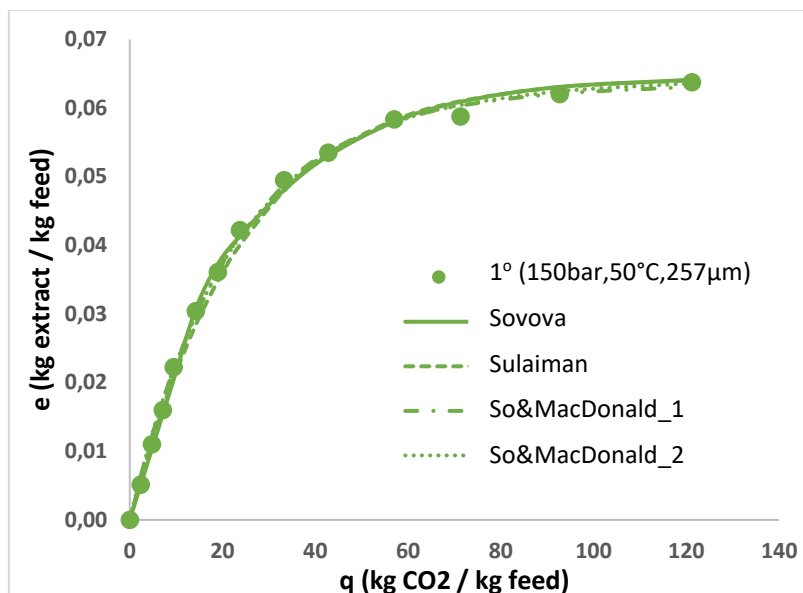
Από τον Πίνακα 17 παρατηρείται ότι αυξανόμενης της πίεσης αυξάνεται και η διαλυτότητα y_r , όπως επίσης και με αύξηση της θερμοκρασίας (50°C). Το ίδιο συμβαίνει και για το x_o , τη μέγιστη δυνατή ποσότητα ελαίου που μπορεί να εκχυλιστεί στις δεδομένες συνθήκες.

Η μεταβλητή x_k , δηλαδή η συγκέντρωση του παγιδευμένου ελαίου στα φύλλα εξαρτάται από το x_o και την κοκκομετρία της πρώτης ύλης. Για τα πειράματα 1 έως 4 στα οποία η κοκκομετρία είναι ίδια παρατηρείται ότι ο λόγος x_k/x_o είναι σταθερός και ίσος με 0.58. Στο πέμπτο πείραμα όπου αλλάζει η κοκκομετρία, μεταβάλλεται και ο λόγος $x_k/x_o = 0.68$. Περισσότερο έλαιο είναι παγιδευμένο στις κυτταρικές δομές των φύλλων.

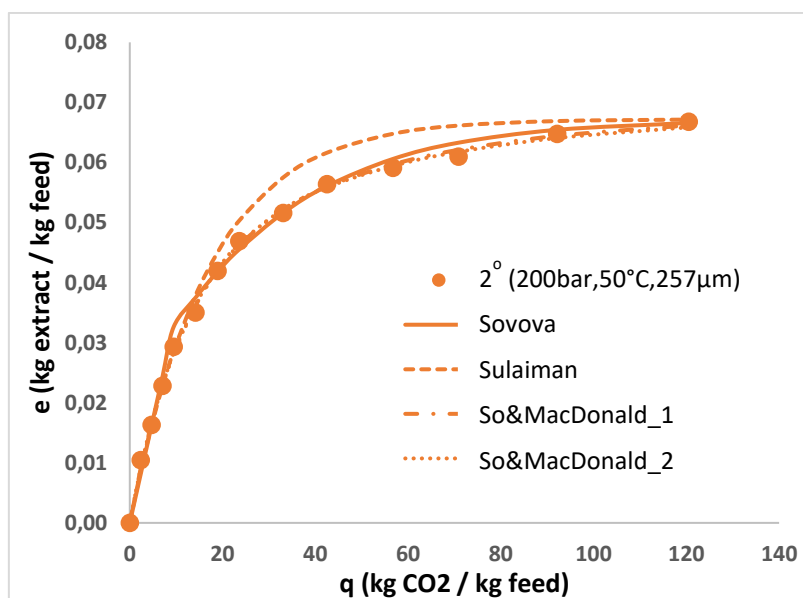
Επιπροσθέτως, συμπεραίνεται ότι το $Z \cdot \dot{q}$ είναι τρεις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερο από το $W \cdot \dot{q}$, γεγονός που παρατηρείται και σε άλλες μελέτες [40].

4.5.4. Σύγκριση μοντέλων

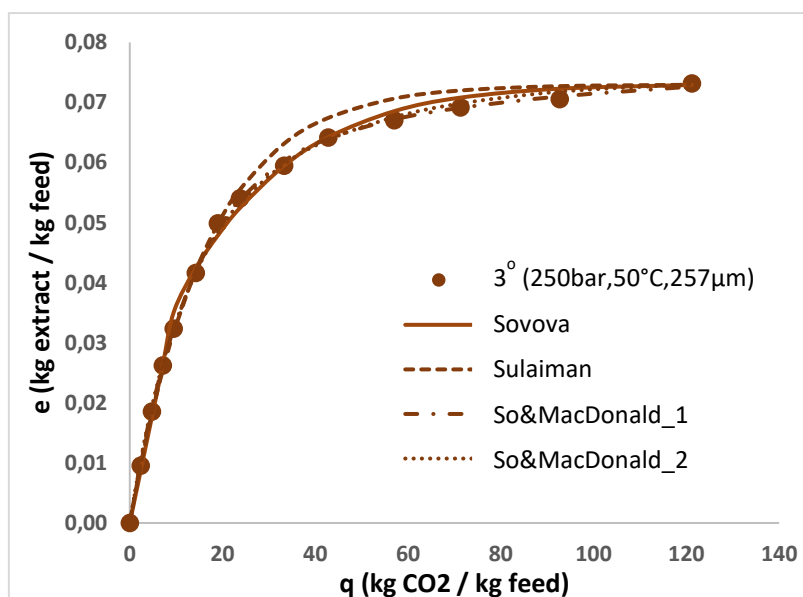
Στα επόμενα διαγράμματα απεικονίζεται η συμπεριφορά των μοντέλων για κάθε πείραμα ξεχωριστά.



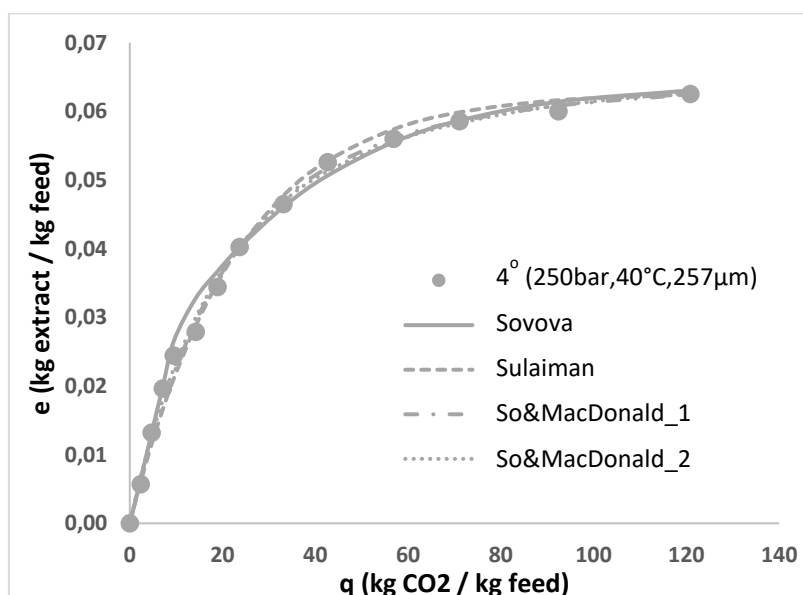
Διάγραμμα 16: Σύγκριση των εξεταζόμενων μαθηματικών μοντέλων στην περιγραφή της καμπύλης εκχύλισης του πειράματος 1



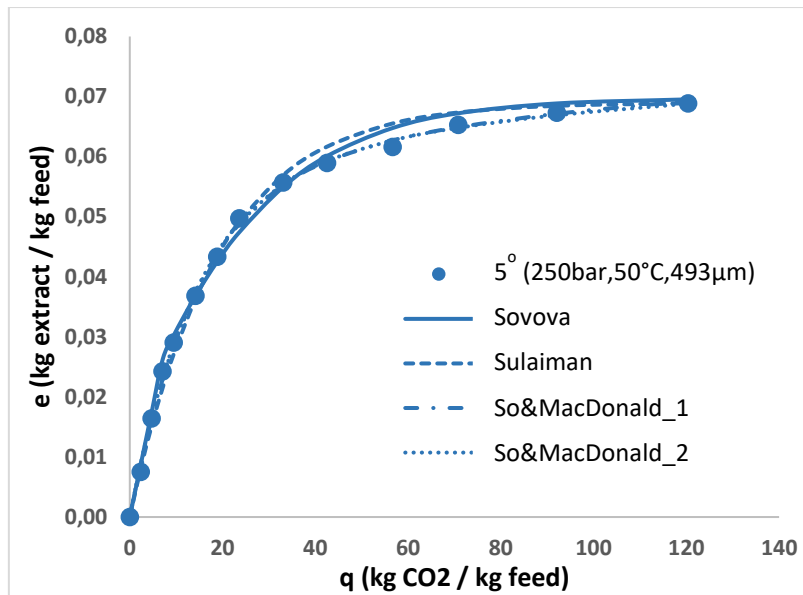
Διάγραμμα 17: Σύγκριση των εξεταζόμενων μαθηματικών μοντέλων στην περιγραφή της καμπύλης εκχύλισης του πειράματος 2



Διάγραμμα 18: Σύγκριση των εξεταζόμενων μαθηματικών μοντέλων στην περιγραφή της καμπύλης εκχύλισης του πειράματος 3



Διάγραμμα 19: Σύγκριση των εξεταζόμενων μαθηματικών μοντέλων στην περιγραφή της καμπύλης εκχύλισης του πειράματος 4



Διάγραμμα 20: Σύγκριση των εξεταζόμενων μαθηματικών μοντέλων στην περιγραφή της καμπύλης εκχύλισης του πειράματος 5

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι αποκλίσεις των μοντέλων για όλα τα πειράματα προκειμένου να σχολιασθούν.

Πίνακας 18: Απόλυτη Μέση Απόκλιση όλων των μοντέλων

exp	Sulaiman	So&Mac_1	So&Mac_2	Sovona
1	3.84	3.99	4.20	2.49
2	6.15	2.17	2.26	4.22
3	2.84	1.18	1.86	2.78
4	4.74	4.09	4.15	4.09
5	6.06	2.44	2.51	3.99
$\overline{AAD}\%$	4.73	2.77	2.99	3.51

Συμπερασματικά, το μοντέλο Sulaiman αδυνατεί να δώσει καλή προσαρμογή στην καμπύλης της εκχύλισης μετά το τέλος του ευθύγραμμου τμήματος. Ο λόγος είναι ότι δε λαμβάνει υπόψη τα διακριτά στάδια της υπερκρίσιμης εκχύλισης και γι' αυτό συνίσταται μόνο για μια πρώτη εκτίμηση της διεργασίας και όχι για υπολογισμούς κλιμάκωσης μεγέθους.

Επίσης, το μοντέλο των So & MacDonald παρουσιάζει μικρότερο σφάλμα στην περίπτωση που επιλύεται με την προσαρμογή τριών παραμέτρων από ότι στην περίπτωση προσαρμογής δύο παραμέτρων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί το να τεθεί η μεταβλητή Y_e^w ίση με το τέλος του ευθύγραμμου τμήματος των πειραματικών σημείων περιλαμβάνει κάποια αβεβαιότητα.

Κατά τα άλλα, στα μοντέλα So & MacDonald και Sonona γίνεται διαφοροποίηση περισσότερων του ενός σταδίου και τα αποτελέσματα είναι τα επιθυμητά. Το μέσο σφάλμα είναι μικρότερο στο So & MacDonald και δεδομένου ότι περιλαμβάνει απλούστερες εξισώσεις είναι προτιμότερο. Ωστόσο, το μοντέλο Sonona περιγράφει καλύτερα τα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα στη διεργασία της υπερκρίσιμης εκχύλισης και περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικά με τις ιδιότητες του υπερκρίσιμου διαλύτη και της πρώτης ύλης ενώ ταυτόχρονα δέχεται την ύπαρξη κατεστραμμένων και μη κυτταρικών δομών.

5. Συμπεράσματα – Προτάσεις

5.1. Γενικά Συμπεράσματα

Η στροφή προς τα φυσικά προϊόντα που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια έχει ήδη εντάξει το εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς στην αγορά, στο χώρο της φαρμακοποιίας και των τροφίμων. Το εκχύλισμα αυτό περιέχει πολύτιμα συστατικά και προέρχεται από μία ανεκμετάλλευτη πρώτη ύλη η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς ηθικούς και οικονομικούς φραγμούς, αφού δεν αποτελεί βρώσιμο προϊόν. Η επεξεργασία των φύλλων της ελιάς, λοιπόν είναι δυνατό να γίνει με μια «Πράσινη Τεχνολογία» και αυτός είναι και ο σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας στην οποία εξετάζεται η υπερκρίσιμη εκχύλιση.

Η συγκεκριμένη πρώτη ύλη επιλέχθηκε όχι μόνο λόγω της αφθονίας της στον Ελλαδικό χώρο αλλά περισσότερο λόγω των αξιόλογων ιδιοτήτων που παρουσιάζουν τα συστατικά της, τα κυριότερα εκ των οποίων είναι η ελαιοευρωπαϊνή και η υδροξυτυροσόλη. Μελέτες αναφέρουν αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, καρδιοπροστατευτική και άλλες δράσεις που προάγουν την ανθρώπινη υγεία με φυσικό τρόπο.

Η ανάκτηση των βιο-δραστικών αυτών ουσιών επιλέχθηκε να γίνει με υπερκρίσιμη εκχύλιση μέσω CO_2 , καθώς απαιτεί ήπιες θερμοκρασιακές συνθήκες και η πρώτη ύλη είναι θερμοευαίσθητη. Ακόμα, ο διαλύτης είναι φιλικός προς το περιβάλλον ως μη τοξικός και οδηγεί σε ιδιαίτερα καθαρά και ποιοτικά εκχυλίσματα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω μελετήθηκαν οι κύριες λειτουργικές συνθήκες της διεργασίας και η σύγκρισή τους για την εύρεση των βέλτιστων τιμών έγινε με βάση την απόδοση και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, εξετάσθηκε η επίδραση της πίεσης, της θερμοκρασίας, της κοκκομετρίας των φύλλων και της προσθήκης συν-διαλύτη. Τα εκχυλίσματα, τα οποία και κλασματώθηκαν αναλύθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με τη μέθοδο DPPH και ως προς το ολικό φαινολικό τους περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η μοντελοποίηση της υπερκρίσιμης εκχύλισης με τρία μαθηματικά μοντέλα των Sulaiman, So & MacDonald και Sonova.

Οι πιέσεις που επεξεργάστηκαν είναι τα 150, 200 και 250 bar. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε υψηλότερη πίεση επιτυγχάνεται καλύτερη απόδοση και αυτό οφείλεται στην αύξηση της πυκνότητας του διαλύτη και συνεπώς της διαλυτικής του ικανότητας. Καλύτερα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά παρατηρήθηκαν στο εκχύλισμα της υψηλότερης πίεσης (250 bar) παρόμοια όμως με αυτά των 200 bar. Το γεγονός αυτό έγκειται στο ότι με την υψηλή πίεση εκχυλίζονται και βαρύτερα συστατικά τα οποία ίσως δεν αντιστοιχούν σε αντιοξειδωτικά.

Αύξηση της απόδοσης παρατηρήθηκε και κατά την υψηλότερη θερμοκρασία μεταξύ 40 και 50 °C. Η υψηλότερη τιμή θερμοκρασίας μειώνει την πυκνότητα του

CO₂ στις υπερκρίσιμες συνθήκες, όμως ταυτόχρονα αυξάνει την τάση ατμών των επιθυμητών ουσιών και άρα εκχυλίζονται ευκολότερα στο διαλύτη. Τα εκχυλίσματα στους 40°C δεν φάνηκε να περιέχουν ικανοποιητικό ποσό φαινόλων και συνεπώς αντιοξειδωτικών, όμως στους 50 °C τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά. Βέβαια, θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 55 °C είναι δυνατόν να έχουν καταστρεπτική επίδραση στην επιθυμητές προς εκχύλιση ουσίες.

Εν συνεχεία, η επίδραση της κοκκομετρίας των αλεσμένων φύλλων δεν ήταν ιδιαίτερα σημαντική, ωστόσο μικρότερη διάμετρος των κόκκων οδήγησε σε μεγαλύτερη απόδοση. Κατά την άλεση των φύλλων απελευθερώνεται έλαιο διευκολύνοντας τη διάχυση και κατά συνέπεια την εκχύλιση. Μέτρια ποσά φαινολικών ενώσεων βρέθηκαν που όμως δεν απέδωσαν σε αντιοξειδωτική δράση.

Η τελευταία παράμετρος που εξετάστηκε είναι η προσθήκη συν-διαλύτη. Επιλέχθηκε η αιθανόλη ως διαλύτης χαμηλής τοξικότητας και το ιοντικό υγρό 2 – HEAF. Η χρήση των ιοντικών υγρών ως διαλύτες κατά την εκχύλιση είναι μια νέα σχετικά τεχνολογία και οι μετρήσεις σε αυτή τη διπλωματική είναι πρωταρχικές. Τα πειράματα με συν-διαλύτη αιθανόλη απέδωσαν σε υψηλότερη τιμή της απόδοσης συγκριτικά με εκείνα του καθαρού CO₂. Ταυτόχρονα, η προσθήκη 10% αιθανόλης επέφερε καλύτερα αποτελέσματα από την προσθήκη 5%. Το συμπέρασμα αυτό συνάδει και με τις δύο μεθόδους ανάλυσης των εκχυλισμάτων. Το μίγμα αιθανόλης - ιοντικού υγρού οδήγησε σε ελαφρά υψηλότερη απόδοση της Υ.Ε. ωστόσο τα υγρά εκχυλίσματα της διεργασίας αυτής ήταν λιγότερο δραστικά από εκείνα με συν-διαλύτη αιθανόλη.

Σύμφωνα με τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η βέλτιστη απόδοση της Υ.Ε. που συνδυάζει το ποιοτικότερο εκχύλισμα προκύπτει από το πείραμα με πίεση 250 bar, θερμοκρασία 50 °C, μέση κοκκομετρία 257 μm και συν-διαλύτη αιθανόλη 10% στη ροή CO₂. Παρ' όλα αυτά, η προσθήκη συν-διαλύτη απαιτεί μια επιπλέον διεργασία εξάτμισης. Επομένως, οι βέλτιστες συνθήκες εξαρτώνται και από τη χρήση για την οποία προορίζεται το προϊόν και φυσικά από το κόστος της διεργασίας. Στην περίπτωση που προτιμάται το καθαρό εκχύλισμα οι καλύτερες παράμετροι εκχύλισης είναι οι ίδιες (250bar, 50 °C, 257 μm).

Κατά τη μοντελοποίηση της διεργασίας αποδείχθηκε ότι το μοντέλο Sulaiman δεν περιγράφει ικανοποιητικά το φαινόμενο καθώς θεωρεί ένα μόνο στάδιο εκχύλισης. Τα επόμενα δύο μοντέλα προσαρμόζονται καλά στα πειραματικά δεδομένα με το So & MacDonald να παρουσιάζει μικρότερο σφάλμα αλλά το Sonona να περιγράφει αναλυτικότερα τα φυσικά φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα. Τα δύο τελευταία μοντέλα είναι κατάλληλα για υπολογισμούς κλιμάκωσης μεγέθους της διεργασίας. Δεν πρέπει να παραλείπεται όμως το γεγονός ότι περιλαμβάνουν παραδοχές οι οποίες μπορεί να μην ισχύουν για μεγαλύτερης κλίμακας κλίνες. Επομένως, συχνά απαιτούνται πειραματικά δεδομένα από διατάξεις διαφορετικής δυναμικότητας για τον ασφαλή σχεδιασμό.

Κλείνοντας, αξίζει να σημειωθεί ότι η υπερκρίσιμη εκχύλιση φύλλων ελιάς με CO₂ καθίσταται μια πολλά υποσχόμενη διεργασία με πολλά οφέλη, τόσο στον άνθρωπο όσο και ως προς το περιβάλλον.

5.2. Προτάσεις για το Μέλλον

Το θέμα της υπερκρίσιμης εκχύλισης των φύλλων ελιάς με CO₂ δε θα μπορούσε να εξαντληθεί από μια διπλωματική εργασία. Η περαιτέρω έρευνα και ανάλυση είναι απαραίτητη.

Πιο συγκεκριμένα, θα ήταν καλό τα εκχυλίσματα να χαρακτηριστούν και ως προς άλλες δράσεις όπως πχ. η αντιμικροβιακή και να γίνουν κλινικές μελέτες. Είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν και οι επιμέρους ενώσεις των εκχυλισμάτων ενδεχομένως με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας HPLC.

Επιπροσθέτως, ενδείκνυται η μελέτη περισσότερων μη τοξικών συν-διαλυτών και η εφαρμογή διαφορετικών αναλογιών. Φυσικά επιβάλλεται και η έρευνα πάνω στα ιοντικά υγρά ως συν-διαλύτες.

Πρόκληση αποτελεί και η αύξηση της επιλεκτικότητας των διαλυτών και η στόχευση σε συγκεκριμένες ουσίες (πχ. Υδροξυτυροσώλη), πάντα με την προϋπόθεση της διατήρησης του φυσικού χρώματος και αρώματος του εκχυλίσματος.

Τέλος, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν μεγαλύτερης κλίμακας πειράματα (πιλοτικής κλίμακας) ώστε να λυθούν οποιαδήποτε τεχνικά προβλήματα προκύψουν και να γίνει μια οικονομική και τεχνική αξιολόγηση αυτής της τεχνολογίας.

6. Βιβλιογραφία

- [1] Δ. Παπαγιαννόπουλος στο λήμμα "Ελαία", Μεγάλη Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια Π. Δρανδάκη, Αθήνα.
- [2] Εγκυκλοπαίδεια, "ΠΑΠΥΡΟΣ LAROUSSE BRITANICA", τόμος 19, λήμμα «Ελιά», 190-197.
- [3] Le Tutour, Bernard, and Didier Guedon. "Antioxidative activities of Olea europaea leaves and related phenolic compounds." *Phytochemistry* 31.4 (1992): 1173-1178.
- [4] {HYPERLINK "<https://docplayer.gr/5000601-Fainolikes-enoseis-oi-fainolikes-enoseis-apoteloy-n-mia-apo-tis-kyries-omades-deyterogenon-metavoliton-apoteloyntai-apo-enoseis-me-megali-poikilia.html>"}
- [5] Jemai, Hedya, et al. "Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves." *Chemico-Biological Interactions* 176.2-3 (2008): 88-98.
- [6] Le Floch, F., et al. "Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves." *Talanta* 46.5 (1998): 1123-1130.
- [7] Αγγελική Αϊναλίδου, 2008. Δευτερογενείς μεταβολίτες από φυτά της ελληνικής χλωρίδας με επίδραση στην ανάπτυξη φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Μεταπτυχιακή διατριβή. Εργαστήριο Γεωργικής Χημείας. Σχολή Γεωπονίας. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- [8] Şahin, Selin, Mehmet Bilgin, and Mehmet Umur Dramur. "Investigation of oleuropein content in olive leaf extract obtained by supercritical fluid extraction and soxhlet methods." *Separation Science and Technology* 46.11 (2011): 1829-1837.
- [9] Lee, Ok-Hwan, and Boo-Yong Lee. "Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in Olea europaea leaf extract." *Bioresource technology* 101.10 (2010): 3751-3754.
- [10] Issaoui, Aimen, Hatem Ksibi, and Mohamed Ksibi. "Supercritical fluid extraction of triterpenes and aliphatic hydrocarbons from olive tree derivatives." *Arabian Journal of Chemistry* 10 (2017): S3967-S3973.
- [11] Baldino, Lucia, et al. "Concentrated oleuropein powder from olive leaves using alcoholic extraction and supercritical CO₂ assisted extraction." *The Journal of Supercritical Fluids* 133 (2018): 65-69.

- [12] Japón-Luján, R., J. M. Luque-Rodríguez, and MD Luque De Castro. "Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves." *Journal of Chromatography A* 1108.1 (2006): 76-82.
- [13] Japón-Luján, R., and MD Luque de Castro. "Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves." *Journal of Chromatography A* 1136.2 (2006): 185-191.
- [14] Al-Otoom, Awni, et al. "Extraction of oil from uncrushed olives using supercritical fluid extraction method." *The Journal of Supercritical Fluids* 95 (2014): 512-518.
- [15] Xynos, Nikos, et al. "Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves." *The Journal of Supercritical Fluids* 67 (2012): 89-93.
- [16] Ghoreishi, Seyyed M., R. Gholami Shahrestani, and Hassan S. Ghaziaskar. "Experimental and modeling investigation of supercritical extraction of mannitol from olive leaves." *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology* 32.1 (2009): 45-54.
- [17] {HYPERLINK "<https://top10supps.com/best-olive-leaf-supplements/>"}
- [18] Kiritsakis, Kostas, et al. "Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87.4 (2010): 369-376.
- [19] Raventós, M., S. Duarte, and R. Alarcón. "Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: an overview." *Food Science and Technology International* 8.5 (2002): 269-284.E.
- [20] Warren L. McCabe, Julian C. Smith, Peter Harriott, "Βασικές Διεργασίες Χημικής Μηχανικής", 7^η έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα (2016), 695.
- [21] Dimitrios P. Tassios, "ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΧΗΜΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ", Μετάφραση-επιστημονική επιμέλεια Κ. Μαγουλάς, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα (2001): 206-208, 683.
- [22] Βουτσάς, Κ. Μαγουλάς, "Ειδικά Κεφάλαια Θερμοδυναμικής", Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα (2007): 69
- [23] {HYPERLINK "<https://www.chemengonline.com/supercritical-co2-a-green-solvent/?printmode=1>"}

- [24] Temelli, Feral. "Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils." *The Journal of Supercritical Fluids* 47.3 (2009): 583-590
- [25] Marsh, Kenneth N., et al. "Room temperature ionic liquids as replacements for conventional solvents—A review." *Korean Journal of Chemical Engineering* 19.3 (2002): 357-362.
- [26] Darrell D. Ebbing, Steven D. Gammon, "General Chemistry", ninth edition, Houghton Mifflin Company, Boston, New York (2009): 335.
- [27] Armstrong, Daniel W., Lingfeng He, and Yan-Song Liu. "Examination of ionic liquids and their interaction with molecules, when used as stationary phases in gas chromatography." *Analytical chemistry* 71.17 (1999): 3873-3876.
- [28] Bicak, Niyazi. "A new ionic liquid: 2-hydroxy ethylammonium formate." *Journal of Molecular Liquids* 116.1 (2005): 15-18.
- [29] Alevizou, Efthimia I., and Epaminondas C. Voutsas. "Solubilities of p-coumaric and caffeic acid in ionic liquids and organic solvents." *The Journal of Chemical Thermodynamics* 62 (2013): 69-78.
- [30] BRAND-WILLIAMS, W. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *Food Sci. Technol.* 28 (1999): 1231-1237.
- [31] Shahidi, Fereidoon, P. K. Janitha, and P. D. Wanasundara. "Phenolic antioxidants." *Critical reviews in food science & nutrition* 32.1 (1992): 67-103.
- [32] Σωτηρούδης, Θεόδωρος Γ. "Ελεύθερες ρίζες, αντιοξειδωτικά και υγεία." 2004. 207-225.
- [33] Blainski, Andressa, Gisely Lopes, and João de Mello. "Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L." *Molecules* 18.6 (2013): 6852-6865.
- [34] Reverchon, E. "Mathematical modeling of supercritical extraction of sage oil." *AIChE Journal* 42.6 (1996): 1765-1771.
- [35] Sulaiman, Sarina, AR Abdul Aziz, and Mohamed Kheireddine Aroua. "Optimization and modeling of extraction of solid coconut waste oil." *Journal of Food Engineering* 114.2 (2013): 228-234.

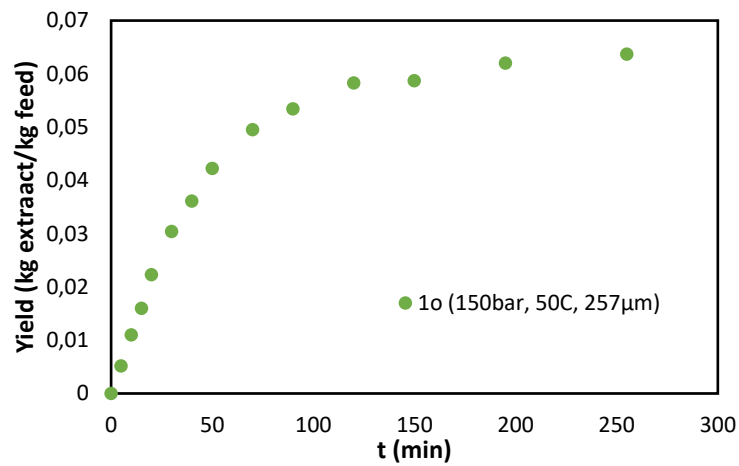
- [36] So, George C., and Douglas G. MacDonald. "Kinetics of oil extraction from canola (rapeseed)." *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 64.1 (1986): 80-86.
- [37] Sovová, H., J. Kučera, and J. Jež. "Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂—II. Extraction of grape oil." *Chemical Engineering Science* 49.3 (1994): 415-420.
- [38] Sovová, Helena. "Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂—I. Modelling of extraction curves." *Chemical Engineering Science* 49.3 (1994): 409-414.
- [39] Papamichail, I., V. Louli, and K. Magoulas. "Supercritical fluid extraction of celery seed oil." *The Journal of Supercritical Fluids* 18.3 (2000): 213-226.
- [40] Louli, V., et al. "Extraction of parsley seed oil by supercritical CO₂." *The Journal of supercritical fluids* 30.2 (2004): 163-174.
- [41] {HYPERLINK "https://www.engineeringtoolbox.com/ethanol-ethyl-alcohol-density-specific-weight-temperature-pressure-d_2028.html?vA=27°ree=C#"}
- [42] {HYPERLINK "<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Formic-acid>"}
- [43] {HYPERLINK "<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanolamine>"}
- [44] De Lucas, A. de, et al. "Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves." *The Journal of Supercritical Fluids* 22.3 (2002): 221-228.
- [45] Fluid Property Calculator, {HYPERLINK "<https://www.irc.wisc.edu/properties/>"}
- [46] Cardinali, Angela, et al. "Biological activity of high molecular weight phenolics from olive mill wastewater." *Journal of agricultural and food chemistry* 58.15 (2010): 8585-8590.
- [47] Hagerman, Ann E., et al. "High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants." *Journal of agricultural and food chemistry* 46.5 (1998): 1887-1892.
- [48] So, George C., and Douglas G. MacDonald. "Kinetics of oil extraction from canola (rapeseed)." *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 64.1 (1986): 80-86.

[49] Mattedi, Silvana, et al. "High pressure CO₂ solubility in N-methyl-2-hydroxyethylammonium protic ionic liquids." *The Journal of Supercritical Fluids* 56.3 (2011): 224-230.

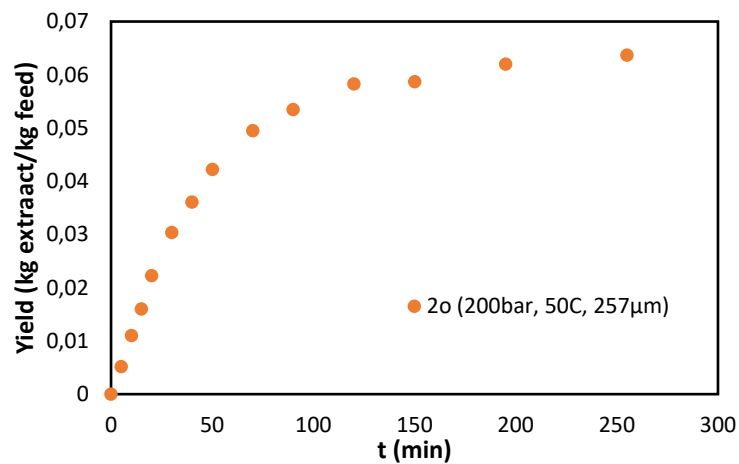
[50] Mohamed, Mbarka Ben, et al. "The LC-MS/MS characterization of phenolic compounds in leaves allows classifying olive cultivars grown in south Tunisia." *Biochemical Systematics and Ecology* 78 (2018): 84-90.

Παράρτημα 1

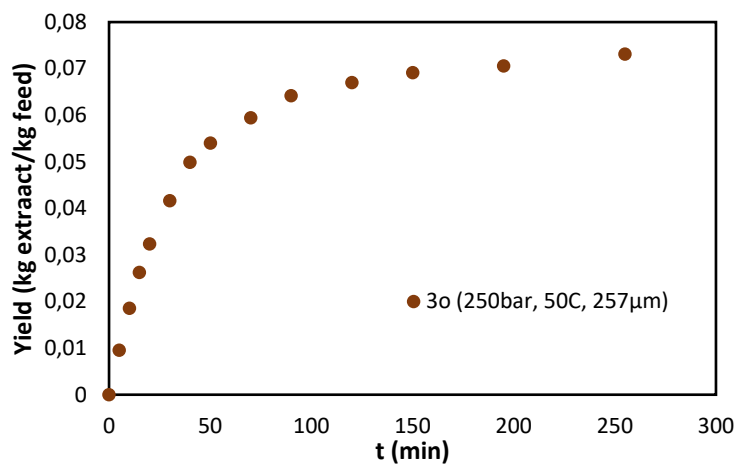
Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζεται η εξέλιξη της απόδοσης για κάθε πείραμα συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης.



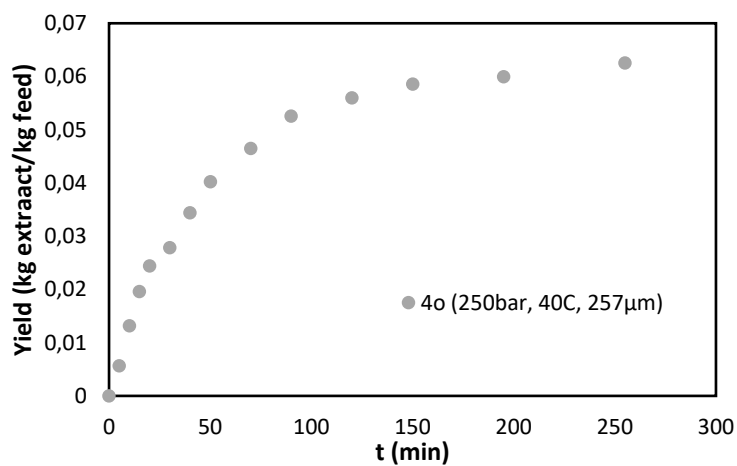
Διάγραμμα 21: Εξέλιξη της Απόδοσης % ως προς το χρόνο για το πείραμα 1



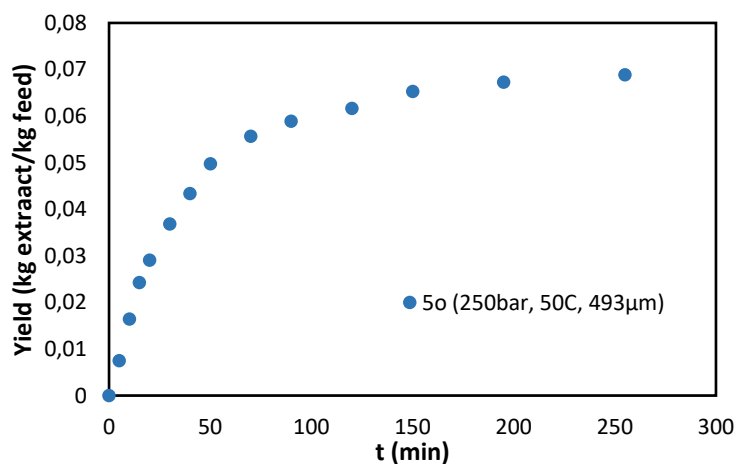
Διάγραμμα 22: Εξέλιξη της Απόδοσης % ως προς το χρόνο για το πείραμα 2



Διάγραμμα 23: Εξέλιξη της Απόδοσης % ως προς το χρόνο για το πείραμα 3



Διάγραμμα 24: Εξέλιξη της Απόδοσης % ως προς το χρόνο για το πείραμα 4



Διάγραμμα 25: Εξέλιξη της Απόδοσης % ως προς το χρόνο για το πείραμα 5

Από τα διαγράμματα αυτά φαίνεται ότι το στάδιο της πλύσης τελειώνει περίπου στα 50 – 60 min αλλά ο χρόνος αυτός διαφοροποιείται ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος.

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Ελαιόδενδρο	11
Εικόνα 2: Ελιά Κορωνέικη.....	12
Εικόνα 3: Ελιά Καλαμών	12
Εικόνα 4: Χημική Ένωση Ελαιοευρωπαϊκής	15
Εικόνα 5: Χημική Ένωση Υδροξυτυροσόλης	15
Εικόνα 6: Φύλλα Ελιάς	32
Εικόνα 7: Πλύση Φύλλων Ελιάς.....	32
Εικόνα 8: Φυσική Ξήρανση Φύλλων Ελιάς	32
Εικόνα 9: Φούρνος Κενού (Gallenkamp)	33
Εικόνα 10: Πολυκόφτης Moulinex	34
Εικόνα 11: Τάρακτος Octagon digital Endecotts.....	34
Εικόνα 12: Κοκκομετρίες φύλλων ελιάς, αριστερά <425, δεξιά 425/710.....	34
Εικόνα 13: : Δοχείο αποθήκευσης πρώτης ύλης	34
Εικόνα 14: Συσκευή Υπερκρίσιμης Εκχύλισης SFE - 500 SEPAREX.....	36
Εικόνα 15: Δοχεία Συλλογής εκχυλίσματος με καθαρό CO ₂	42
Εικόνα 16: Δοχεία Συλλογής Εκχυλίσματος με συν-διαλύτη.....	42
Εικόνα 17: Δοχεία συλλογής υπολειμάτων από καθαρισμούς	42
Εικόνα 18: Διάταξη συν-διαλύτη στην Υ.Ε.....	42
Εικόνα 19: Φούσκωμα μπαλιονιού από τη φιάλη αζώτου	44
Εικόνα 20: Διάταξη σύνθεσης ιοντικού υγρού	44
Εικόνα 21: Συσκευή Φυγοκέντρωσης mini Spin eppendorf	44
Εικόνα 22: Συσκευή Εξάτμισης υπό κενό G3 Heidolph.....	45
Εικόνα 23: Παραδείγματα μιγμάτων DPPH και αντιοξειδωτικών σε διάφορες αραιώσεις μετά την εξουδετέρωση	46
Εικόνα 24: Διήθηση υπό κενό ανθρακικού νατρίου	47
Εικόνα 25: Μίγμα μετά τη φυγοκέντρωση.....	48

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Διάγραμμα Φάσεων Διοξειδίου του Άνθρακα σε προβολή P – T....	17
Διάγραμμα 2: Απλοποιημένο Διάγραμμα Ροής της Διεργασίας Υπερκρίσιμης Εκχύλισης.....	19
Διάγραμμα 3: Διάγραμμα Ροής Συσκευής Υπερκρίσιμης Εκχύλισης, SFE - 500 SEPAREX	35
Διάγραμμα 4: Εξέλιξη της απόδοσης % ως προς την ποσότητα του διαλύτη ανοιγμένη προς την τροφοδοσία για τα πειράματα 1 - 5.....	50
Διάγραμμα 5: Επίδραση της πίεσης στην απόδοση της Υ.Ε. για τα πειράματα 1, 2, 3 (50°C, 2kg/h, 257μm).....	51
Διάγραμμα 6: Επίδραση της θερμοκρασίας στην απόδοση της Υ.Ε. για τα πειράματα 3, 4 (250bar, 2kg/h, 257μm)	52
Διάγραμμα 7: Επίδραση της κοκκομετρίας στην απόδοση της Υ.Ε. για τα πειράματα 3, 5 (250bar, 2kg/h, 50°C)	53
Διάγραμμα 8: Δείκτης IC ₅₀ για τα εκχυλίσματα των πειραμάτων 3, 6, 7	56
Διάγραμμα 9: Δείκτης IC ₅₀ για τα πειράματα 6-8.....	57
Διάγραμμα 10: Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο εκχυλισμάτων για τα πειράματα 1-7.....	58
Διάγραμμα 11: Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο εκχυλισμάτων με συν-διαλύτη....	59
Διάγραμμα 12: Προσαρμογή Μοντέλου Sulaiman στα Πειραματικά Δεδομένα .	60
Διάγραμμα 13: Προσαρμογή μοντέλου So & MacDonald_1 στα πειράματα 1 - 5 .	62
Διάγραμμα 14: Προσαρμογή μοντέλου So & MacDonald_2 στα πειράματα 1 - 5	64
Διάγραμμα 15: Προσαρμογή μοντέλου Sonona στα πειράματα 1 - 5.....	66
Διάγραμμα 16: Σύγκριση των εξεταζόμενων μαθηματικών μοντέλων στην περιγραφή της καμπύλης εκχύλισης του πειράματος 1	68
Διάγραμμα 17: Σύγκριση των εξεταζόμενων μαθηματικών μοντέλων στην περιγραφή της καμπύλης εκχύλισης του πειράματος 2	68
Διάγραμμα 18: Σύγκριση των εξεταζόμενων μαθηματικών μοντέλων στην περιγραφή της καμπύλης εκχύλισης του πειράματος 3	69
Διάγραμμα 19: Σύγκριση των εξεταζόμενων μαθηματικών μοντέλων στην περιγραφή της καμπύλης εκχύλισης του πειράματος 4.....	69
Διάγραμμα 20: Σύγκριση των εξεταζόμενων μαθηματικών μοντέλων στην περιγραφή της καμπύλης εκχύλισης του πειράματος 5	70
Διάγραμμα 21: Εξέλιξη της Απόδοσης % ως προς το χρόνο για το πείραμα 1	80

Διάγραμμα 22: Εξέλιξη της Απόδοσης % ως προς το χρόνο για το πείραμα 2	80
Διάγραμμα 23: Εξέλιξη της Απόδοσης % ως προς το χρόνο για το πείραμα 3	81
Διάγραμμα 24: Εξέλιξη της Απόδοσης % ως προς το χρόνο για το πείραμα 4.....	81
Διάγραμμα 25: Εξέλιξη της Απόδοσης % ως προς το χρόνο για το πείραμα 5	81

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Κρίσιμες Ιδιότητες Διαλυτών	18
Πίνακας 2: Φυσικά Χαρακτηριστικά ιοντικού υγρού 2 - HEAF].....	24
Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά Μεγέθη SFE - 500 (SEPAREX).....	37
Πίνακας 4: Σταθερά στοιχεία πειραμάτων Υ.Ε.....	40
Πίνακας 5: Λειτουργικές Παράμετροι Πειραμάτων	41
Πίνακας 6: Αποτελέσματα Ξήρανσης και Μέτρηση Υγρασίας των φύλλων ελιάς	49
Πίνακας 7: Απόδοση Πειραμάτων Υ.Ε.	49
Πίνακας 8: Πυκνότητα διοξειδίου του άνθρακα στους 50°C για διάφορες τιμές πίεσης	51
Πίνακας 9: Πυκνότητα διοξειδίου του άνθρακα στα 250 bar για διάφορες τιμές θερμοκρασίας.....	52
Πίνακας 10: Αποτελέσματα Αντιοξειδωτικής Δράσης Εκχυλισμάτων (1)	55
Πίνακας 11: Αποτελέσματα Αντιοξειδωτικής Δράσης Εκχυλισμάτων (2).....	56
Πίνακας 12: Αποτελέσματα Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου για τα πειράματα 1 - 7	58
Πίνακας 13: Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο εκχυλισμάτων με συν-διαλύτη (mg GAE/g υγρού εκχυλίσματος)	59
Πίνακας 14: Παράμετροι και σφάλμα μοντέλου Sulaiman.....	61
Πίνακας 15: Παράμετροι και σφάλμα μοντέλου So & MacDonald_1.....	63
Πίνακας 16: Παράμετροι και σφάλμα μοντέλου So & MacDonald_2	65
Πίνακας 17: Παράμετροι και σφάλμα μοντέλου Sonona	67
Πίνακας 18: Απόλυτη Μέση Απόκλιση όλων των μοντέλων	70

